

MÁRCIA RIBEIRO TERLUK

**RESPOSTAS VASCULARES MEDIADAS PELO ÓXIDO
NÍTRICO: EFEITOS DE AGENTES OXIDANTES NA
HIPOREATIVIDADE À FENILEFRINA E NO RELAXAMENTO
INDUZIDO POR TIÓIS**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Farmacologia do Centro de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do título
de Doutora em Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

**Florianópolis
2005**

Terluk, Márcia R. **RESPOSTAS VASCULARES MEDIADAS PELO ÓXIDO NÍTRICO: EFEITOS DE AGENTES OXIDANTES NA HIPOREATIVIDADE À FENILEFRINA E NO RELAXAMENTO INDUZIDO POR TIÓIS** Florianópolis, 2003, 142p. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Jamil Assreuy

Defesa: 31/05/2005

A exposição de anéis de aorta de rato à doadores de óxido nítrico (NO) e ao lipopolissacarídeo (LPS) induz a hiporeatividade de longa duração a vasoconstritor, um evento vascular encontrado no choque séptico em humanos e em animais endotoxêmicos. O presente estudo investigou a modulação das respostas vasculares mediadas pelo NO, e em especial a hiporeatividade a vasoconstritor e o relaxamento induzido por tióis. Entre os principais resultados obtidos, a presente investigação demonstra significativa potencialização da hiporeatividade à fenilefrina em duas condições experimentais: i) com o aumento da concentração de doador de óxido, o S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP) e ii) com a ausência da camada endotelial. Este efeito mediado pelas células endoteliais foi caracterizado como um efeito protetor da camada endotelial, o qual não está associado à produção de ânion superóxido (O_2^-), angiotensina II, endotelina (via receptores ET-A), produtos derivados das enzimas ciclooxigenase (COX), lipooxigenase, citocromo P-450 e NO sintase endotelial (eNOS). O efeito oxidante do ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), o DTNB (um agente não permeante as membranas celulares), previne e reverte a hiporeatividade à fenilefrina de longa duração mediada pelo SNAP, evidenciando o envolvimento de grupamentos sulfidrilas em proteínas da superfície externa da membrana plasmática. Outro agente oxidante, a diamida, também foi capaz de prevenir a hiporeatividade à fenilefrina evocada pelo SNAP, porém o mesmo não foi obtido com o agente redutor o ditioneitol (DTT). Em vasos expostos ao SNAP, tióis de baixo peso molecular (L-cisteína e N-acetilcisteína) induzem relaxamento, mesmo após um decurso temporal prolongado. A hiporeatividade à fenilefrina causada pelo SNAP também foi revertida com as várias exposição dos vasos a L-cisteína. O DTNB inibiu o vasorelaxamento promovido pelo NS1619 via ativação de BK_{Ca} , mas não alterou o relaxamento mediado pelo 8-bromoguanosina 3',5'-monofosfato cíclico (8-Br-GMPc) e acetilcolina. Estes resultados revelam que o DTNB interfere com a hiporeatividade e vasorelaxamento produzidos pelo NO, em parte, através da inibição da atividade dos canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de alta condutância (BK_{Ca}). Em modelos experimentais endotoxêmicos, o DTNB também foi eficiente em prevenir e reverter a hiporeatividade vascular à fenilefrina causado por LPS e reduziu em até 30 % a mortalidade de camundongos tratados com *Escherichia coli* (*E. coli*). Já o relaxamento mediado pela L-cisteína em vasos expostos ao SNAP depende da ativação da guanilato ciclase solúvel e da abertura de subtipos de canais de K^+ , sensíveis a alta concentração de K^+ , mas insensíveis ao tetraetilamônio (TEA), 4-aminopiridina, glibenclamina, clotrimazol e caribdotoxina.

RESUMO

O choque séptico é uma síndrome caracterizada pela presença de hipotensão, hiporeatividade a vasoconstritores e hipoperfusão. Em parte, estes eventos vasculares estão associados a vários mecanismos moleculares que envolvem a expressão da óxido nítrico (NO) sintase induzida (iNOS), síntese de NO, ativação da enzima guanilato ciclase solúvel e canais de K^+ e, a formação de S-nitrosotióis. O presente estudo demonstra que a exposição *in vitro* de anéis de aorta torácica de rato à doadores de NO, S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP) e trinitrato de glicerila, induziu hiporeatividade à fenilefrina de longa duração. Em vasos com e sem endotélio, o aumento da intensidade da hiporeatividade à fenilefrina foi dependente do aumento da concentração do SNAP. A ausência da camada endotelial potencializa a hiporeatividade à fenilefrina produzida pelo NO, caracterizando um efeito protetor vascular do endotélio, não associado à produção de ânion superóxido (O_2^-), angiotensina II, endotelina (via receptores ET-A), produtos derivados das enzimas ciclooxigenase (COX), lipooxigenase, citocromo P-450 e NO sintase endotelial (eNOS). O ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB (um agente oxidante que não permeia a membrana celular), previne e reverte a hiporeatividade à fenilefrina de longa duração mediada pelo SNAP e, na ausência do endotélio, o DTNB demonstrou maior eficácia em prevenir o efeito do NO. Estes achados evidenciam a participação de específicos grupamentos sulfidrilas presentes nas proteínas das membranas celulares, e em especial na musculatura lisa vascular. Em vasos com endotélio, a prevenção da hiporeatividade à fenilefrina causada pelo SNAP também foi verificada com outro agente oxidante, a diamida, mas não com o uso de agente redutor como o ditioneitol (DTT) em anéis sem endotélio. A adição de L-cisteína e N-acetilcisteína, tióis de baixo peso molecular, promoveu marcante relaxamento de longa duração em vasos pré-incubados com SNAP, sugerindo que a hiporeatividade e o vasorelaxamento são eventos relacionados a S-nitrosação de resíduos de cisteína e a mobilização de NO. As várias adições de L-cisteína reverteram a hiporeatividade à fenilefrina em vasos com endotélio pré-incubados com SNAP. O efeito oxidante do DTNB bloqueou o relaxamento promovido pela ativação de canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de alta condutância (BK_{Ca}) mediado pelo NS1619, sugerindo que o DTNB inibe os eventos vasculares causados pelo NO, hiporeatividade e relaxamento, em parte, via BK_{Ca} . Entretanto, o DTNB não foi capaz de modificar o vasorelaxamento causado pelo 8-bromoguanosina 3',5'-monofosfato cíclico (8-Br-GMPc, um análogo de GMPc) e pela acetilcolina, e ainda, não promoveu relaxamento em vasos pré-incubados com SNAP. Em vasos pré-contráídos com endotelina-1 (ET-1), o relaxamento para L-cisteína associado ao SNAP foi prevenido através da exposição vascular ao DTNB. Em contraste, o SNAP não foi eficaz de causar hiporeatividade endotelinérgica de longa duração. Em experimentos *ex vivo*, o DTNB foi eficiente em reverter a hiporeatividade à fenilefrina em vasos de animais tratados com LPS. Além disso, o co-tratamento de animais com LPS e DTNB, 4 e 6 horas após a endotoxina, também aboliu totalmente a hiporeatividade à fenilefrina, em vasos sem endotélio. O DTNB previne e reverte a hiporeatividade à fenilefrina induzida pelo SNAP *in vivo*. Em camundongos, a administração de *Escherichia coli* (*E. coli*) causou mortalidade na ordem de 60 %, e o DTNB administrado 30 min antes da *E. coli* ou, a cada 12 horas após a administração da bactéria, reduziu a mortalidade em 20 e 30 %, respectivamente. O vasorelaxamento mediado pela L-cisteína, em anéis de aorta pré-incubados com o SNAP, depende da ativação da guanilato ciclase solúvel e da abertura de subtipos de canais de K^+ , sensíveis a alta concentração de K^+ , mas insensíveis ao tetraetilamônio (TEA), 4-aminopiridina, glibenclamina, clotrimazol e caribdotoxina.

ABSTRACT

".... quando se desmembra um organismo vivo, isolando as suas diversas partes, faz-se isso apenas para tornar mais fácil a análise experimental, mas, de forma alguma, para compreendê-las separadamente. Na realidade, quando se deseja determinar o valor e o real significado de uma propriedade fisiológica, é sempre necessário relacioná-la com o todo podendo-se tirar conclusões definitivas apenas quando considerados seus efeitos sobre este."

Claude Bernard (1813 - 1878)

AGRADECIMENTOS

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pelo conhecimento transmitido e incentivo científico.

Ao professor Jamil Assreuy por tornar nossa convivência um aprendizado para ambas as partes e por ter proporcionado este meu vínculo científico com a Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza, Prof. Dr. François German Noël, Dra. Maria Martha Campus, Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau e ao Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi por participarem como membros da comissão examinadora da defesa desta tese de doutorado e por prestarem sugestões importantes para a elaboração da forma final deste trabalho.

A Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau agradeço também o apoio constante e o seu carinho.

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto pelas valiosas sugestões dadas a este estudo durante o exame de qualificação de doutorado, pela concessão de drogas e laboratórios para realização deste estudo e pelo seu grande exemplo de competência científica e ética profissional.

A Profa. Dra. Maria Consuelo Andrade Marques e a Profa. Dra. Lia Rieck do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná pela amizade e pelo ensinamento do valor do trabalho científico.

Ao José Eduardo da Silva Santos agradeço pela sua grande amizade, pelas estimulantes discussões científicas e pelas ricas sugestões dadas a esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo por fornecer o lipopolissacarídeo (LPS) que contribuiu para obtenção de importantes resultados apresentados neste estudo.

Ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae pela gentileza em doar a endotelina-1 (ET-1) e o BQ123 que auxiliaram a realização deste estudo e pelo constante incentivo.

A Adriane Madeira pela sua amizade e apoio técnico prestado para o desenvolvimento dos experimentos.

Ao Laboratório Clínico Santa Luzia pela concessão de alíquotas de *E. coli* para execução de ensaios experimentais *in vivo*.

Ao Laboratório Cristália Produtos Farmacêuticos pela doação de heparina sódica utilizada para a realização dos experimentos.

Ao Octávio Menezes de Lima Junior pela sua atenção e valiosas sugestões dadas durante a finalização desta pesquisa.

A Daniella Cabrini pela amizade e pela ajuda concedida durante o exame de qualificação de doutorado.

Ao Daniele Balz pela sua amizade e pela sua agradável companhia durante os experimentos que realizei no Laboratório do Prof. Dr. João Batista Calixto.

Ao Daniel Fernandes e a Renata S. A. Costa pela inestimável amizade e parceria em trabalhos realizados durante o doutorado.

A Elayne Pereira pela sua amizade sempre presente e pelo seu estímulo.

A Maria Claudia Santos da Silva, Rodrigo Quintanilha Vêras, Emiliana Domingues Cunha da Silva, Carla Cristina Thober Charão, Regina de Sordi e Gustavo Campos Ramos pela amizade e harmoniosa convivência.

Aos meus pais, Nair Ribeiro Terluk e Jaroslau Terluk, meus especiais e eternos agradecimentos, pelo exemplo força, honestidade e trabalho e, pelo constante apoio.

Ao meu sobrinho e afiliado Matheus por ser muito especial em minha vida.

Aos demais familiares que também contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

Ao Felipe Nocon pelo seu amor e companherismo durante todos estes anos de doutorado.

Ao Funcionários do Departamento de Farmacologia e do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pelo suporte e cordialidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão de bolsa de doutorado para a consolidação desta Pós-Graduação.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIACÕES.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Óxido Nítrico e Sinalização Celular.....	17
1.2. Sepses, Sepses Severas e Choque Séptico.....	33
2. OBJETIVOS.....	43
2.1. OBJETIVO GERAL.....	43
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
3.2. MODELOS EXPERIMENTAIS.....	45
3.2.1. Preparação de anéis de aorta de rato.....	45
3.2.2. Medida da pressão arterial média em ratos anestesiados.....	47
3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	48
3.3.1. Efeito do SNAP sobre as contrações induzidas pela fenilefrina em anéis de aorta.....	48
3.3.2. Análise dos mecanismos envolvidos na hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta.....	48
3.3.3. Efeito do SNAP sobre o relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta.....	49
3.3.4. Efeito do DTNB sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP e GTN em anéis de aorta.....	50
3.3.5. Efeito da diamida sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta.....	50
3.3.6. Efeito do ditiotreitol sobre a hiporeatividade à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	51
3.3.7. Efeito da L-cisteína e N-acetilcisteína em anéis de aorta expostos a doadores de NO.....	51

3.3.8. Efeito do DTNB sobre a resposta induzida por L-cisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP e GTN e pré-contraídos com fenilefrina.....	52
3.3.9. Efeito da diamida sobre a resposta induzida por L-cisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP e pré-contraídos com fenilefrina.....	53
3.3.10. Efeito do DTNB sobre o relaxamento induzido por 8-Br-GMPc e NS1619 em anéis de aorta incubados com SNAP e pré-contraídos com fenilefrina.....	53
3.3.11. Efeito do DTNB e do SNAP sobre as contrações induzidas por endotelina e as respostas produzidas por L-cisteína em anéis de aorta.....	54
3.3.12. Efeito do DTNB sobre o relaxamento induzido pelo SNAP em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina.....	54
3.3.13. Efeito do DTNB em anéis de aorta incubados com SNAP e pré-contraídos com fenilefrina.....	55
3.3.14. Efeito do DTNB sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em ratos anestesiados.....	55
3.3.15. Efeito do DTNB sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo LPS em anéis de aorta.....	56
3.3.16. Efeito do DTNB sobre a mortalidade de animais endotoxêmicos.....	57
3.3.17. Efeito de compostos sobre a resposta induzida por L-cisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP e pré-contraídos com fenilefrina	57
3.4. DROGAS.....	58
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
4.0. RESULTADOS.....	61
4.1. Influência da camada endotelial sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP.....	61
4.2. Análise da participação de mediadores derivados do endotélio na redução da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP.....	64
4.3. Efeito da pré-incubação com SNAP sobre o vasorelaxamento	

mediado pela acetilcolina.....	67
4.4. Análise do efeito do DTNB sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP e GTN.....	68
4.4.1. Efeito da pré-exposição de anéis de aorta com e sem endotélio ao DTNB sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina produzida pelo SNAP.....	68
4.4.2. Efeito da exposição de anéis de aorta com endotélio ao DTNB após a indução da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina produzida pelo SNAP e GTN.....	70
4.5. Análise do efeito da diamida sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP.....	73
4.5.1. Efeito da pré-exposição de anéis de aorta com endotélio a diamida sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina produzida pelo SNAP.....	73
4.6. Efeito da exposição de anéis de aorta sem endotélio ao DTT após a indução da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina produzida pelo SNAP.....	74
4.7. Caracterização da resposta de vasorelaxamento de longa duração causada pela L-cisteína e N-acetilcisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP.....	75
4.8. Efeito do decurso temporal sobre o vasorelaxamento de longa duração causada pela L-cisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP	76
4.9. Efeito da L-cisteína sobre a hiporeatividade à fenilefrina em anéis de aorta expostos ao SNAP.....	78
4.10. Efeito da pré-exposição ao DTNB sobre o relaxamento causado pela L-cisteína em anéis de aorta com e sem endotélio incubados com o SNAP e o GTN.....	79
4.11. Efeito da pré-exposição ao DTNB sobre o relaxamento induzido por 8-Br-GMPc e NS1619 em anéis de aorta com endotélio incubados com SNAP e pré-contraídos com fenilefrina.....	81
4.12. Efeito do DTNB e do SNAP sobre as contrações induzidas por endotelina e a resposta promovida pela L-cisteína em anéis de aorta...	84

4.13. Análise do efeito do DTNB sobre o relaxamento induzido pelo SNAP e do efeito do DTNB em vasos pré-incubados com SNAP.....	85
4.14. Efeito da pré-exposição a diamida sobre o relaxamento causado pela L-cisteína em anéis de aorta com endotélio incubados com o SNAP.....	86
4.15. Efeito do DTNB sobre a hiporeatividade à fenilefrina induzida por SNAP em ratos anestesiados.....	87
4.16. - Efeito do DTNB em modelos endotoxêmicos de hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo LPS em anéis de aorta e a sobrevida de camundongos tratados com <i>E. coli</i>.....	88
4.17. Análise dos mecanismos envolvidos na resposta induzida pela L-cisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP.....	91
5.0. DISCUSSÃO.....	93
6.0. CONCLUSÕES.....	118
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
8.0. ANEXO.....	142

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito do SNAP sobre as contrações induzidas pela fenilefrina em anéis de aorta com e sem endotélio.....	63
Figura 2 - Efeito da SOD e MnTBAP sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta com endotélio.....	65
Figura 3 - Efeito de compostos sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta com endotélio.	66
Figura 4 - Efeito da pré-incubação com SNAP sobre o relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta com endotélio.....	67
Figura 5 - Efeito do DTNB na prevenção da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta com e sem endotélio.....	69
Figura 6 - Efeito do DTNB na reversão da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta sem endotélio.	71
Figura 7 - Efeito do DTNB na reversão da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo GTN em anéis de aorta com endotélio.....	72
Figura 8 - Efeito da diamida na prevenção da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta com endotélio.	73
Figura 9 - Efeito do DTT sobre da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta sem endotélio.....	74
Figura 10 - Efeito da L-cisteína e N-acetilcisteína em anéis de aorta com e sem endotélio expostos ao SNAP.....	76
Figura 11 - Efeito do decurso temporal na resposta para L-cisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP.	77
Figura 12 - Efeito da L-cisteína sobre a hiporeatividade à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio expostos ao SNAP.....	78
Figura 13 - Efeito da pré-exposição ao DTNB sobre relaxamento causado pela L-cisteína em anéis de aorta com e sem endotélio incubados com o SNAP.....	80

Figura 14 - Efeito da pré-exposição ao DTNB sobre relaxamento causado pela L-cisteína em anéis de aorta com endotélio incubados com o GTN.....	81
Figura 15 - Efeito da pré-exposição ao DTNB sobre o relaxamento induzido por 8-Br-GMPc e NS1619 em anéis de aorta com endotélio incubados com SNAP e pré-contraídos com fenilefrina.....	83
Figura 16 - Efeito da pré-exposição de anéis de aorta com endotélio ao DTNB e SNAP sobre as contrações induzida por endotelina e a resposta promovida por L-cisteína.....	85
Figura 17 - Efeito do DTNB sobre o relaxamento induzido pelo SNAP e o efeito do DTNB após a incubação com SNAP em anéis com endotélio pré-contraídos com fenilefrina.....	86
Figura 18 - Efeito da pré-exposição a diamida sobre relaxamento causado pela L-cisteína em anéis de aorta com endotélio incubados com o SNAP.	87
Figura 19 - Efeito do DTNB sobre a hiporeatividade à fenilefrina induzida pelo SNAP em ratos anestesiados.....	88
Figura 20 - Efeito do DTNB em modelos de endotoxemia	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito de compostos sobre a resposta contrátil para fenilefrina.....	64
Tabela 2 - Efeito do DTNB sobre a resposta contrátil para fenilefrina...	70
Tabela 3 - Efeito de compostos na resposta induzida por L-cisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP.....	92

LISTA DE ABREVIÇÕES

8-Br-GMPc	8-bromoguanosina 3',5'-monofosfato cíclico
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BK _{Ca}	Canais de K ⁺ sensíveis ao Ca ²⁺ de alta condutância
CAM	Calmodulina
CCR	Curva concentração-resposta
CDR	Curva dose-resposta
CLP	Ligadura e perfuração do ceco
COX	Ciclooxigenase
CuZn-SOD	Superóxido dismutase cobre-zinco
DNIC	Complexo ferro dinitrosil
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
e.p.m.	Erro padrão da média
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Etilenoglicol-bis(β-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraácido acético
ET-1	Endotelina-1
eNOS; NOS-3; Tipo III	Óxido nítrico sintase endotelial
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FMN	Mononucleotídeo de flavina
FRDE; EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
GMPc	Monofosfato cíclico de 3'-5' guanosina
Grupamento sulfidril	Ânion tiolato; tiol
GSH	Glutationa reduzida
GSNO	S-nitrosoglutationa
GTN	Nitroglicerina; trinitrato de glicerila
GTP	Trifosfato de guanosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HNO ₂	Ácido nítrico
<i>i.m.</i>	Intramuscular
<i>i.p.</i>	Intraperitonal
<i>i.v.</i>	Intravenosa
IFN	Interferon
IK _{Ca}	Canais de K ⁺ de condutância intermediária sensíveis ao Ca ²⁺
IL	Interleucina
iNOS; NOS-2; Tipo II	Óxido nítrico sintase induzida
IP ₃	1,4,5-trifosfato inositol
K _{ATP}	Canais de K ⁺ sensíveis ao ATP
K _{ir}	Canais de K ⁺ de influxo retificante
K _v	Canais de K ⁺ sensíveis ao ATP
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginina metil éster
L-NMMA	N ^o -monometil-L-arginina
LPS	Lipopolissacarídeo
N ₂ O ₃	Trióxido de dinitrogênio

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAP	N-acetil-DL-penicilamina
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS; NOS-1; Tipo I	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO	Monóxido de nitrogênio
NO ⁻	Ânion nitroxil; nitrosila
NO ⁻ <i>singlet</i>	HNO
NO ⁻ <i>triplet</i>	NOH
NO [·]	Óxido nítrico
NO ⁺	Cátion nitrosônio
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ODQ	1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a-quinoxalin-1
-OH	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ONOOH	Ácido peroxinitroso
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Salina tamponada com fosfatos
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependentes de GMPc
R _{máx}	Resposta máxima contrátil
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
ROH	Resíduo hidroxil
RR'NH	Amina nucleofílica
RS'	Radical tiil
RSH	Tiol
RSNO	S-nitrosilação
RSSR	Disulfeto
-S	Enxofre
s.c.	Subcutânea
SDMO	Síndrome da Disfunção de Órgãos Múltiplos
Serotonina	5-hidroxitriptamina
SIN-1	3-morfolinil sidnonimina
SK _{Ca}	Canais de K ⁺ de baixa condutância sensíveis ao Ca ²⁺
SNAP	S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina
S-nitrosotióis	Tionitrito
SNP	Nitroprussiato de sódio
-SO ₂ H	Sulfinico
SOD	Superóxido dismutase
-SOH	Sulfenico
SRIS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
S-S	Disulfeto
TEA	Tetraetilamônio
THB ₄	(6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
CID	Coagulação intravascular disseminada

1. INTRODUÇÃO

1.1. Óxido Nítrico e Sinalização Celular

A identificação da existência do óxido nítrico (NO) em sistemas biológicos foi observada em 1980, quando Furchgott e Zawadzki demonstraram que o vasorelaxamento induzido por acetilcolina dependia da ação de um fator liberado por células endoteliais. Baseados nesses resultados, em 1982, Cherry, Furchgott e colaboradores atribuíram à nova substância a denominação de fator relaxante derivado do endotélio (FRDE ou *Endothelium-Derived Relaxing Factor*, EDRF). Mais tarde, Palmer, Ferrige e Moncada (1987) mostraram evidências que indicaram a identidade química entre o EDRF e o NO. Em 1988, Ignarro e colaboradores confirmaram a identidade química do NO em músculo liso venoso e arterial.

A descoberta de um novo princípio de sinalização celular em mamíferos e outras espécies através de um gás inorgânico, conferiu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina aos cientistas norte-americanos Dr. Robert F. Furchgott, Dr. Louis J. Ignarro e Dr. Ferid Murad em 1998. O nome do cientista sul-americano, naturalizado inglês, Dr. Salvador Moncada foi indicado mas, no entanto, não foi incluído nesta premiação. Esta decisão foi considerada injusta por grande parte da comunidade científica. Furchgott declarou que o comitê da referida premiação deveria ter aberto uma exceção e escolhido um quarta pessoa, o Dr. Salvador Moncada, para compartilhar o prêmio (de Berrazueta, 1999).

Após o período de descoberta, seguiram-se anos de intensas investigações envolvendo o NO, originando inúmeros trabalhos que demonstraram que o NO é um mediador fundamental no metabolismo e no funcionamento fisiológico celular, bem como participa de vários processos patológicos.

Assim, a sinalização celular decorrente do NO promove efeitos biológicos distintos, definidos como protetores, regulatórios e deletérios (Wink e Mitchell, 1998), os quais dependem de múltiplos fatores como a concentração

gerada de NO e a interação desta molécula com diversos alvos (Pagliaro, 2003; Espey et al., 2000).

O NO é sintetizado pela família de enzimas NO sintases (NOS), a partir da oxidação do nitrogênio guanidino terminal do aminoácido L-arginina. As NOS são hemoproteínas com estruturas moleculares homodiméricas na forma ativa, contendo individualmente o domínio C-terminal redutase e o domínio N-terminal oxidase, que apresentam sítios de ligação com importância funcional a estas enzimas. O domínio C-terminal redutase contém sítios de ligação para calmodulina (CAM), mononucleotídeo de flavina (FMN), dinucleotídeo de flavina (FAD) e para nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Já o domínio N-terminal oxidase contém sítios de ligação para (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (THB₄) e para o grupo ferro protoporfirina IX (heme), que catalisam a reação de oxidação da L-arginina em presença de oxigênio molecular (O₂). Estudos adicionais demonstraram que as NOS formam estruturas moleculares que contêm dois monômeros associados a duas CAM. Em cada monômero, o FAD e o FMN do domínio redutase atuam como regiões aceptoras de dois elétrons provenientes do NADPH, o qual é convertido em NADP⁺. Seqüencialmente, os cofatores de flavina (FAD e FMN) transferem um dos elétrons para o domínio heme, formando um radical intermediário estável. Desta forma, os elétrons passam do domínio redutase de um monômero para o domínio oxidase do outro monômero da NOS. Além disso, o fluxo de elétrons segue a seqüência, NADPH, FAD e FMN, sendo que a ligação da CAM aumenta a razão de transferência do elétron proveniente do NADPH para os domínios flavina e heme redutase. Por sua vez, o grupamento heme Fe²⁺ é convertido para heme Fe³⁺ após a ligação do O₂, (Fe²⁺-O₂ → Fe³⁺-O₂⁻). A associação da THB₄ com a NOS promove a ativação do sítio de ligação da L-arginina, formando a interface dimérica da enzima. Em seguida, o domínio heme da NOS catalisa a N^o-hidroxilação do substrato para N^o-hidroxil-L-arginina, e na seqüência ocorre a síntese de NO e L-citrulina, como co-produto. Neste processo catalítico das NOS, 1 mol de L-arginina consome 1 mol de NADPH e 1 mol de O₂, gerando concentrações de 1 mol de NO e 1 mol de L-arginina (Marletta, 1993; Alderton et al., 2001).

As diferentes NOS foram identificadas e descritas e, entre 1989 e 1994, foram clonadas e seqüenciadas. Os estudos de biologia molecular revelaram a existência de três isoformas com grau de homologia em torno de 60% com algumas enzimas do complexo citocromo P-450 redutase.

Algumas das principais diferenças entre as NOS estão relacionadas com o padrão de expressão das enzimas e de produção de NO, além das respostas mediadas nos diversos tipos celulares. Duas destas enzimas são expressas constitutivamente, a isoforma neuronal (nNOS, NOS-1 ou Tipo I) e a isoforma endotelial (eNOS, NOS-3 ou Tipo III), as quais foram identificadas em neurônios de rato e em células endoteliais bovinas, respectivamente (Förstermann e Kleinert, 1995). A terceira isoforma, denominada de iNOS, NOS-2 ou Tipo II, foi descrita inicialmente em macrófagos, e a expressão desta enzima ocorre após a estimulação celular (Hecker et al., 1999). Além do sistema nervoso central e periférico, a nNOS foi também encontrada em células não neuronais, como células do músculo esquelético, miocárdio e do plexo mioentérico. A eNOS foi detectada também em neurônios e células epiteliais do túbulo renal (Wu, 2002).

No sistema nervoso central, o NO sintetizado pela nNOS participa da plasticidade sináptica, liberação de neurotransmissores, regulação de genes, neurorecaptação e desenvolvimento neuronal (Dawson e Dawson et al., 1998). Já o NO derivado da eNOS regula vários eventos fisiológicos como o tônus vascular, a pressão arterial, a agregação plaquetária e a adesão de leucócitos (Moncada et al., 1991, Palmer et al., 1997). O nível de expressão da eNOS pode ser regulado através de alguns estímulos como o aumento do estresse de cisalhamento em células endoteliais, ou reduzido através de estímulos inflamatórios como o fator de necrose tumoral α (TNF- α). Por outro lado, a expressão da iNOS depende da exposição celular às citocinas pró-inflamatórias (interleucina; IL-1, interferon; IFN- γ e TNF- α), bactérias (gram-negativas e gram-positivas) e produtos bacterianos (endotoxinas). Estes agentes indutores atuam isoladamente, ou de maneira sinérgica, no processo de indução da iNOS (Alderton et al., 2001). O lipopolissacarídeo (LPS; uma endotoxina) e o ácido lipoteicóico são componentes de paredes bacterianas

provenientes de bactérias gram-negativas e gram-positivas, respectivamente (Hecker et al., 1999). Em casos de sepse, a endotoxina é liberada a partir da lise de bactérias (Anderson et al., 2001). Estudos recentes demonstram que o LPS promove ativação de macrófagos e outros tipos celulares através da interação com os receptores *Toll-like*, promovendo respostas celulares de defesa (Hecker et al., 1999). Na sepse ou em outras condições patológicas como um politrauma, a ligação do LPS com os receptores *Toll-like* do tipo 4 de monócitos em humanos modula a resposta imune (Tamandl et al., 2003). Ademais, a expressão da iNOS pode ser diminuída pela ação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e fatores de crescimento (e.g. fator de crescimento tumoral β) e quimiocinas. Em vários tipos celulares, tem sido demonstrada a expressão da iNOS, como em neutrófilos, fibroblastos, endotélio vascular, células do músculo liso, do epitélio tubular renal, miócitos, hepatócitos, neurônios e astrócitos. Em condições fisiológicas, a iNOS encontra-se também expressa constitutivamente em alguns locais, incluindo o epitélio respiratório e no útero grávido. Após a expressão da iNOS, esta isoenzima é capaz de sintetizar grandes quantidades de NO, na ordem de micromolar, e por períodos prolongados, quando comparado às NOS constitutivas (Hecker et al., 1999). Em macrófagos expostos a IFN- γ e LPS, o ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para iNOS e a própria proteína (iNOS) são detectados duas e quatro horas após a estimulação, respectivamente. Além disso, a proteína para iNOS pode permanecer presente por vários dias após estimulação celular (Xie et al., 1992). No entanto, a contínua atividade da iNOS é diretamente influenciada pela biodisponibilidade dos co-fatores e do substrato, descritos anteriormente. Esta excessiva produção de NO gerada pela iNOS está relacionada com a patofisiologia de várias doenças inflamatórias como a artrite reumatóide, miocardite, colite, glomerulonefrite, choque séptico e outras condições patológicas como o câncer, diabetes e desordens neurodegenerativas. Por outro lado, a expressão e a atividade da iNOS pode ser também benéfica, como um mecanismo compensatório ao declínio da produção de NO pela camada endotelial, garantindo a relativa homeostasia vascular em casos de angioplastia e vasculopatia (Hecker et al., 1999).

Conforme abordado anteriormente, a síntese de NO requer a ligação da CAM com as diferentes isoformas. Esta ligação da CAM é mediada pela associação do Ca^{+2} presente no meio intracelular, formando o complexo Ca^{2+} -CAM. As NOS constitutivas e a induzida requerem concentrações de Ca^{2+} distintas, na ordem de micromolar (0,1 a 1 μM) e nanomolar (100 nM, uma concentração equivalente ao nível basal intracelular), respectivamente. Entretanto, as isoformas constitutivas são classificadas como dependentes, e a iNOS como independente de Ca^{2+} (Alderton et al., 2001).

Em relação ao substrato das NOS, sabe-se que em condições fisiológicas, o nível plasmático de L-arginina é em torno de 100 μM , sendo que o transporte deste aminoácido para o interior da célula é realizado por uma família de proteínas transportadoras de aminoácidos catiônicos. Assim, a possível variação da biodisponibilidade da L-arginina corresponde a um outro fator regulador na síntese de NO (Durante, 2001).

Em humanos, existem três genes distintos para as NOS, localizados nos cromossomos 12, 7 e 17 para a nNOS, eNOS e iNOS, respectivamente (Alderton et al., 2001). Estruturalmente, as isoenzimas apresentam massa molecular de 131 kDa para a iNOS, 133 kDa para a eNOS e 160 kDa para a nNOS, constituídas por 1.153 (iNOS), 1.203 (eNOS) e 1.434 (nNOS) aminoácidos (Försterman e Kleinert, 1995). A comparação molecular entre as isoformas revelou homologia em torno de 55% em humanos e, 80 a 90% em diferentes espécies (Griffith e Stuehr, 1995). A alta similaridade estrutural entre as NOS contribui efetivamente para a baixa seletividade dos inibidores sintéticos de NOS. Por sua vez, diversos inibidores de iNOS impedem a atividade enzimática através da interação destas drogas com o sítio de ligação da L-arginina, THB_4 , CAM, grupamento heme e das flavoproteínas (Alderton et al., 2001). Existem diferentes classes de inibidores de iNOS, como os análogos de L-arginina [e.g. L-NAME (N^\ominus -nitro-L-arginina metil éster) e L-aminoarginina], derivados de L-citrulina e L-lisina (e.g. L-tiocitrulina e S-metil-L-tiocitrulina), inibidores de NOS não-aminoácidos [e.g. guanidinas (aminoguanidina), isotiouréias (S-etilisotiouréias) e imidazoles (7-nitroindazol)]. Muitos destes agentes, especialmente as guanidinas, isotioureas e imidazoles, são

amplamente utilizados para os estudos associados ao choque séptico (Vincent et al., 2000).

Estudos adicionais de configuração eletrônica demonstraram que o NO (monóxido de nitrogênio) contém variações quanto ao número de elétrons nos orbitais atômicos, determinando a existência de diferentes formas redox, incluindo o NO \cdot (óxido nítrico), o NO $^+$ (cátion nitrosônio) e o NO $^-$ (ânion nitroxil). O NO \cdot tem um elétron no orbital 2p- π , a remoção deste elétron forma o NO $^+$, e a adição de um elétron neste orbital forma o NO $^-$ (Stamler et al., 1992). Mais recentemente, a partir de estudos do estado energético do radical NO \cdot , foram identificadas as formas: *singlet* (HNO) e *triplet* (NOH) (Pagliaro, 2003). Na literatura, as diferentes espécies radicalares de NO são freqüentemente designadas como NO \cdot , apesar das distintas propriedades químicas destas formas redox. O NO apresenta alta reatividade e uma meia-vida plasmática bastante curta, variando entre 3 e 10 segundos (Vaughn et al., 1998) ou ainda, 6 a 30 segundos (Butler et al., 1995).

Em solução aquosa contendo O $_2$, o NO é oxidado em nitrito (NO $_2^-$) e nitrato (NO $_3^-$) (Hibbs et al., 1988), e a quantificação de nitrito tem sido utilizada como índice da produção de NO, pela reação de Griess, uma técnica colorimétrica. Já o ânion NO $_3^-$, o principal metabólito do NO, tem que ser reduzido a NO $_2^-$, antes da reação colorimétrica. Outras técnicas, como ressonância eletrônica paramagnética, cromatografia líquida de alta performance e quimioluminescência também são ensaios usados para esta finalidade (Viinikka, 1996).

Estudos revelam que em sistemas biológicos o NO reage rapidamente também com outras espécies reativas, resultando em efeitos indiretos do NO mediados por espécies oxidativas e nitrosativas, também citadas como nitrosantes. A reação do NO com O $_2$, denominada de auto-oxidação do NO, pode formar o dióxido de nitrogênio ($2\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_2$) e o trióxido de dinitrogênio ($\text{NO}_2 + \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3$ e $4\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3$), além do NO $_2^-$ e NO $_3^-$, descritos anteriormente. O NO $_2$ participa de reações de oxidação, onde ocorre a transferência de elétrons de uma molécula para outra, formando uma espécie reativa que pode originar reações oxidativas em cadeia, como a reação de

peroxidação lipídica. Já o N_2O_3 libera o NO^+ , que reage com aminas nucleofílicas ($N_2O_3 + RR'NH \rightarrow RR'NNO + H^+ + NO_2^-$), ou com tiol ($N_2O_3 + RSH \rightarrow RSNO + H^+ + NO_2^-$) e resíduo hidroxil ($N_2O_3 + ROH \rightarrow RONO + H^+ + NO_2^-$), originando a reação de nitrosação. Em solução aquosa, o N_2O_3 também forma o NO_2^- através de reação de hidrólise ($N_2O_3 + H_2O \rightarrow 2HNO_2$). Além disso, a reação do NO com ânion superóxido [$O_2 + e^-$ (elétron) $\rightarrow O_2^-$] forma o peroxinitrito ($NO + O_2^- \rightarrow ONOO^-$), um potente agente oxidante de biomoléculas, indutor de peroxidação lipídica, hidroxilação e oxidação de proteínas. O $ONOO^-$ pode originar o NO_2 ($ONOO^- + NO \rightarrow NO_2$) e o ácido peroxidonitroso ($ONOO^- + H^+ \rightarrow ONOOH$), considerado uma espécie altamente oxidante de grupamento tiol. Tendo em vista que o NO reage com o O_2^- e, ambos os mediadores são liberados pelas células endoteliais, a biodisponibilidade destas duas moléculas é essencial para o efeito do NO em inibir a peroxidação lipídica através da redução dos níveis de O_2^- . De fato, o excesso de NO diminui o estresse oxidativo e eventuais lesões vasculares e, tais efeitos apontam importantes implicações clínicas, como por exemplo na aterosclerose (Violi et al., 1999). Assim, o NO participa indiretamente de reações oxidativas e nitrosativas, que pode induzir o estresse oxidativo e nitrosativo celular (Espey et al., 2000).

Ademais, a reação direta da forma original do radical NO, promovendo alteração do substrato, é definida como S-nitrosilação ou nitrosilação (Wink e Mitchell, 1998; Espey et al., 2002). O NO^+ e o NO^- *singlet* reagem com grupamento sulfidríla (ânion tiolato; tiol) presente em resíduos de cisteínas em proteínas, formando os compostos S-nitrosotióis (tionitrito) através da reação de S-nitrosilação ($RSH + NO \rightarrow RSNO$). O NO^+ tem sido considerado como um importante agente nitrosante, que na ausência de um alvo apropriado (p. ex., tiol reduzido), decai para NO_2^- em meio aquoso. De forma predominante, o NO^+ é gerado pela transferência redox entre metal de transição e NO, e assim, metais como ferro e cobre catalisam a formação de S-nitrosotióis (Gow e Ischiropoulos, 2001). Além disso, o NO^- *triplet* não reage preferencialmente com tiol, mas com o O_2^- (Krumenacker et al. 2004). Butler e colaboradores

(1995) descrevem que o papel fisiológico do NO^- tem sido pouco explorado, pois, trata-se de uma molécula extremamente lábil.

Segundo Gow e Ischiropoulos (2001), os principais mecanismos bioquímicos formadores de S-nitrosotióis consistem na reação direta do NO^- , formação do NO^+ e geração de compostos óxidos, como o N_2O_3 . Em compartimentos intracelulares e extracelulares, os S-nitrosotióis de proteínas, peptídeos e aminoácidos formam estoques bioativos de NO. Em sistemas biológicos, a reação do NO com grupamento tiol livre corresponde à formação de um mecanismo de transporte circulante de NO por longas distâncias (Wang et al., 2000). Assim, os S-nitrosotióis são considerados como verdadeiros reservatórios de NO, sendo encontrados no plasma (Stamler, 1994) e em vários tecidos (Gaston et al., 1993). É importante ressaltar que na S-nitrosilação, a reação do NO com grupamento tiol forma uma ligação covalente reversível. Além disso, a S-nitrosilação de grupamento de cisteína tem sido apontada como um mecanismo redox de modificação pós-translacional de específicos alvos celulares (Stamler, 1994). A S-nitrosilação é capaz de alterar funções de diferentes proteínas, como por exemplo de canais iônicos ligados as membranas celulares (Nelson et al., 2003), receptores do retículo sarcoplasmático, incluindo também fatores de transcrição e moléculas de sinalização (Krumenacker et al., 2004). Por exemplo, o NO ativa diretamente os canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de alta condutância (BK_{Ca}), bloqueados pela caribdotoxina (Bolotina et al., 1994) e os receptores rianodínicos do retículo sarcoplasmático (Xu et al., 1998). Várias outras proteínas também estão associadas a S-nitrosilação como a hemoglobina, caspase-3, proteases, proteína G e proteínas quinase (Gow e Ischiropoulos, 2001).

Estudos conduzidos com detecção imunohistoquímica mostraram que a S-nitrosilação de proteínas ocorre em diferentes tecidos, decorrente da atividade das três isoformas de NOS. Destaca-se que a contínua atividade da iNOS acarreta a excessiva S-nitrosilação do grupamento heme da hemoglobina e centros reativos contendo tiol, causando a elevação dos níveis de S-nitrosotióis *in vivo*. Foram detectados níveis de S-nitrosotióis superiores aos

valores normais, associados a expressão da iNOS, em casos de displasia broncopulmonar, pneumonia e sepse. A diminuição dos níveis de S-nitrosotióis foi encontrada em condições patológicas como a asma, fibrose cística, anormalidade perinatal e hipertensão pulmonar. Alguns dos mecanismos indutores das modificações dos níveis de S-nitrosotióis *in vivo* estão relacionados com alterações da formação e do metabolismo dos S-nitrosotióis, variação da expressão das NOS e outros mecanismos não elucidados (Foster et al. 2003).

Após a formação do S-nitrosotiol, o NO incorporado a este composto pode ser transferido para: i) tióis vicinais (*i.e.* na própria estrutura molecular); ii) tióis livres, como a L-cisteína, glutathiona reduzida (GSH) e N-acetilcisteína; ou iii) centros nucleofílicos, através da reação de transnitrosilação ($R^1SNO + R^2S \rightarrow R^2SNO$). Em condições de estresse celular, a diminuição dos níveis de tióis reduzidos inibe a reação de transnitrosilação (Gow e Ischiropoulos, 2001).

A decomposição dos S-nitrosotióis ocorre através de clivagem homolítica ($R-SNO \rightarrow RS^\cdot + NO^\cdot$) e heterolítica ($R-SNO \rightarrow RS' + NO^-$ e $R-SNO \rightarrow RS' + NO^+$), e como resultado, promove a liberação de NO^\cdot , NO^- e NO^+ (Arnelle e Stamler, 1995). O efeito biológico do NO tem sido especialmente atribuído à clivagem homolítica da ligação S-NO e, a liberação do NO^\cdot . Recentemente foi demonstrado que os eventos biológicos causados pela liberação do NO, a partir dos S-nitrosotióis, ocorrem por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos. As principais enzimas responsáveis pela liberação do NO proveniente dos S-nitrosotióis são a γ -glutamil transpeptidase, glutathiona peroxidase e a xantina oxidase. Em especial, a xantina oxidase é uma enzima geradora de O_2^- que pode induzir a decomposição de S-nitrosotióis em condições aeróbicas. A decomposição dos S-nitrosotióis, com subsequente liberação de NO, ocorre também através da luz ultra violeta (340 a 545 nm), alta tensão de O_2 (ex. *g.* S-nitrosoglutationa; $GSNO + O_2 \rightarrow GSSG$ e NO), pH > 2, metal de transição (ex. *g.* Cu^+ , Fe^{2+} , Hg^{2+} e Ag^+) e agente redutor (ex. *g.* tiol e ascorbato). Neste contexto, a reação de transferência do NO pode ser acelerada com o aumento do pH. Algumas enzimas como a superóxido dismutase cobre-zinco (CuZn-SOD) podem catalisar a decomposição do GSNO. Na presença de quelante de metal, como o EDTA (ácido

etilenodiaminotetracético), a decomposição dos RSNO é consideravelmente reduzida pela formação do complexo EDTA-metal. A análise da cinética da reação de GSNO e cisteína mostrou que à presença do tiol livre diminui o tempo de meia-vida do S-nitrosotiol. A reação de tiolação também decompõem o RSNO liberando o NO, através da ação do ânion tiolato ($R'S^-$) sobre o enxofre de compostos nucleofílicos ($RSNO + R'S^- \rightarrow RSSR + NO^-$). Após a clivagem dos S-nitrosotióis, e liberação do NO e do radical tiil (RS'), ocorre a formação de disulfeto (RSSR) através da dimerização do tiil ($R-SNO \rightarrow RS' + NO$ e $RS' + RS' \rightarrow RS-SR$) (Gaston, 1999; Wang et al., 2000; Hogg, 2000). Além disso, a oxidação de tióis por oxidantes, alguns derivados do próprio NO, resulta na formação de disulfeto que pode afetar o metabolismo e a função celular fisiológica. Por outro lado, estas formações também ocorrem espontaneamente em resíduos de cisteína e, participam da estrutura molecular e a atividade de inúmeras proteínas (Wink et al., 1997). Outrossim, parte dos processos de oxidação são decorrentes da reação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com tióis e formação de uma variedade de estados oxidantes do enxofre (-S), ou seja, distintas respostas fenotípicas de resíduos de cisteína, incluindo o disulfeto (S-S), sulfenico (-SOH), sulfinico (-SO₂H) e outros produtos (-SO₂H e -SSG). Tem sido constatado que estas modificações redox (reversíveis e irreversíveis) pós-translacionais, apresentam potencial em produzir diferentes respostas celulares em estímulos fisiológicos (e.g. proliferação de células) e patológicos, como por exemplo em processos inflamatórios. Por sua vez, estas modificações pós-translacionais ocorrem freqüentemente em sistemas biológicos, tendo em vista que o H_2O_2 apresenta certa similaridade com NO, em relação a própria reatividade da molécula e, também a propriedade química em transferir-se para as membranas celulares após a rápida formação desta molécula (Chen et al., 2003a).

O NO derivado a partir das NOS, dos S-nitrosotióis (endógenos e exógenos, abordados posteriormente) e outros doadores de NO, induz sinalização celular mediada por mecanismo dependente e independente da ligação com o complexo ferro (Muller et al., 2002). É interessante ressaltar que o termo doador de NO corresponde a um composto que libera o NO como um

mediador bioativo (Feelisch, 1998). O NO reage diretamente com o complexo ferro causando oxidação, redução ou formação do complexo ferro-nitrosil em proteínas. Dentre as metaloproteínas reativas ao NO encontram-se a enzima guanilato ciclase, o citocromo P-450 e as próprias NOS. A reação de nitrosilação do grupamento heme da guanilato ciclase resulta na formação do complexo ferro-nitrosil e na ativação da enzima (Muller et al., 2002). A guanilato ciclase ativada produz o GMPc (monofosfato cíclico de 3'-5'-guanosina), um segundo mensageiro responsável por funções regulatórias como o vasorelaxamento, motilidade da musculatura lisa, fototransdução e neurotransdução na retina (Lucas et al., 2000). A ativação da guanilato ciclase pelo NO requer baixas concentrações deste mediador, ou seja, uma concentração efetiva 50 % (EC_{50}) de 100 nM, a qual equivale à quantidade de NO produzida pelas NOS constitutivas (Wink e Mitchell, 1998), evidenciando a importância desta via em condições fisiológicas. Devido às várias ações biológicas do NO relacionadas com o aumento de GMPc em diferentes tipos celulares, o efeito do NO foi categorizado em mecanismo dependente e independente de GMPc.

Por sua vez, a atividade do GMPc é regulada pela atividade de fosfodiesterases que degradam este segundo mensageiro. Dados da literatura apontam a existência de duas classes de guanilato ciclase que geram GMPc, a partir da conversão do trifosfato de guanosina (GTP), as quais foram identificadas como a guanilato ciclase particulada e a guanilato ciclase solúvel (Lucas et al., 2000). Atualmente, foram caracterizadas 7 isoformas da guanilato ciclase particulada em mamíferos (classificadas de A a G), as quais localizam-se nas membranas plasmáticas e são ativadas pela interação do domínio extracelular da guanilato ciclase particulada com o ligante, como as enterotoxinas, o peptídeo natriurético atrial e os agentes endógenos homólogos ao *guanilin*. Estudos de clonagem e caracterização da guanilato ciclase solúvel revelaram a existência das subunidades α_1 , β_1 , α_2 e β_2 , que formam um complexo heterodimérico, α e β . Cada subunidade da guanilato ciclase solúvel contém três domínios comuns responsáveis pela estrutura molecular e função da enzima: o domínio C-terminal, o domínio de dimerização e o domínio

N-terminal. O domínio C-terminal constitui a região catalítica da enzima, altamente conservada, responsável pela conversão do GTP em GMPc. Na região média entre as subunidades α e β encontra-se o domínio de dimerização da enzima, que é descrito como um domínio de ligação das duas subunidades. Já o domínio N-terminal é sensível a ligação do NO, contém um domínio heme, constituído por 5 átomos de nitrogênio, formando uma estrutura em anel, e um Fe^{2+} posicionado centralmente. A ligação do NO à subunidade β_1 rompe a ligação de aminoácidos com o Fe^{2+} e forma o complexo ferro-nitrosil. Recentes pesquisas também investigam a regulação da expressão da guanilato ciclase solúvel através de estímulos celulares (Krumenacker et al., 2004), como o LPS (Scott e Nakayama, 1998), $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, análogos de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina), estradiol e do doador de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP) (Krumenacker et al., 2004). Outrossim, o entendimento dos mecanismos de sinalização celular entre o NO, a guanilato ciclase solúvel e o GMPc, tem sido auxiliado pelo uso de compostos que regulam a atividade da guanilato ciclase solúvel, bem como a utilização de análogos de GMPc (Stasch et al., 2002). Haj-Yehia e Benet (1996) propuseram que o SNAP (S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina) também atua diretamente no grupamento heme da guanilato ciclase, através de reação de nitrosação ou transnitrosilação. Estudos reportam que as modificações pós-translacionais da guanilato ciclase solúvel, a quantidade expressa desta enzima e as alterações dos níveis de degradação do GMPc são mecanismos de sensibilização e dessensibilização das respostas mediadas pelo GMPc, que conseqüentemente afeta diretamente o efeito do NO. Por exemplo, no tecido vascular, o aumento da sensibilidade da resposta ao GMPc pode ser ocasionada pela remoção da camada endotelial (Friebe e Koesling, 2003). Já o processo de dessensibilização da via NO/GMPc pode ser decorrente da exposição tecidual ao GTN (nitroglicerina; trinitrato de glicerila) (Schroder et al., 1988).

Os efeitos produzidos pelo GMPc são mediados, em parte, pela ativação da família de proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG), composta pela PKGI α , PKGI β e PKGII. No músculo liso, a redução da resposta contrátil associada a PKG envolve: i) a inibição da liberação de Ca^{2+} do retículo

sarcoplasmático, que é mediada pelos receptores de IP_3 (1,4,5-trifosfato inositol), ii) a redução da probabilidade de abertura dos canais sensíveis à voltagem, especialmente os canais de Ca^{2+} do tipo L, iii) o bloqueio da geração de IP_3 induzida por agonistas e, iv) a ativação dos BK_{Ca} , que resulta em potenciais mais eletronegativos, na hiperpolarização da membrana e, conseqüentemente, na restrição do influxo de Ca^{2+} , via canais de Ca^{2+} dependente de voltagem (Ruth, 1999).

Por outro lado, diferentes mecanismos podem contribuir para diminuição de Ca^{2+} intracelular diretamente através do GMPc no músculo liso, incluindo inibição do influxo de Ca^{2+} e ativação do seqüestro de Ca^{2+} para o interior do retículo sarcoplasmático. Sabe-se que o SNP e o 8-bromoguanosina 3',5'-monofosfato cíclico (8-Br-GMPc; um análogo de GMPc) inibem a fosforilação da cadeia leve de miosina e a resposta contrátil em vasos arteriais (Andriantsitohaina et al., 1995). Outros alvos do GMPc abrangem as proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA), os canais ativados por nucleotídeos cíclicos que regulam o fluxo de íons Ca^{2+} e K^+ em células do sistema cardiovascular (Ruth, 1999).

Os canais iônicos representam um dos maiores mecanismos de transdução de sinalização externa através da membrana celular para o interior da célula. Por sua vez, os mecanismos de sinalização intracelular controlam a atividade e a homeostasia celular (Matalon et al., 2003). Existem vários tipos de canais de K^+ que participam de inúmeras funções biológicas. Os canais de K^+ formam um poro transmembrana, extremamente específico para íons K^+ , que mantêm a concentração de K^+ citoplasmática mais alta (140 mM) em relação ao meio extracelular (4 mM). A abertura dos canais de K^+ implica em uma alteração elétrica de voltagem, induzindo valores menos negativos na membrana celular. Já a hiperpolarização da membrana ocorre em diferentes contextos fisiológicos, como no final do potencial de ação elétrico em células excitáveis e não-excitáveis. Em geral, a atividade dos canais de K^+ é transitória e, depende de uma sinalização celular que deflagre a abertura do canal. Como exemplo, podemos citar que a alteração de voltagem ativa os canais de K^+ , denominados de K_v (canais de K^+ sensíveis à voltagem). Já a concomitante

alteração de voltagem na membrana plasmática e íons Ca^{2+} no citoplasma, ativam os canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} : BK_{Ca} , canais de K^+ de intermediária condutância sensíveis ao Ca^{2+} (IK_{Ca}) e canais de K^+ de baixa condutância sensíveis ao Ca^{2+} (SK_{Ca}). Os canais de K^+ retificadores de influxo, os K_{ir} , apresentam ativação direta por diferentes fatores como proteína G, nucleotídeos e poliaminas. Outrossim, a fosforilação de proteínas representa a sinalização celular de uma grande parte dos canais de K^+ . Entre os diferentes subtipos de canais de K^+ que desempenham um papel importante no controle do potencial ação das membranas celulares em músculo liso vascular e não-vascular, destacam-se os BK_{Ca} . A atividade dos BK_{Ca} participa diretamente da repolarização e hiperpolarização do potencial membrana. Por sua vez, a hiperpolarização da membrana ocasiona o fechamento dos canais de Ca^{2+} , e subsequente, a redução da concentração de Ca^{2+} no compartimento intracelular, gerando o relaxamento e a redução da atividade contrátil do músculo liso. Estes canais são ativados diretamente por GMPc ou indiretamente por PKG . A proteína quinase C (PKC) e a PKA causam inibição e ativação da condutância iônica destes canais, respectivamente (Schubert e Nelson, 2001). Estudos recentes envolvendo clonagem e expressão de BK_{Ca} apontam que o estresse oxidativo é um importante determinante da funcionalidade destes canais. Assim, a atividade dos BK_{Ca} pode ser modulada por espécies oxidativas do metabolismo celular fisiológico e não-fisiológico, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo o O_2^- , ONOO^- e o H_2O_2 . Por exemplo, o efeito oxidativo das EROs pode aumentar (O_2^- e H_2O_2) ou diminuir (ONOO^-) o estado de probabilidade de abertura dos BK_{Ca} . Porém, os vários estudos com eletrofisiologia demonstram que destes efeitos são dependentes do tipo e da concentração das EROs, do tipo celular em estudo e o(s) sítio(s) específico(s) oxidado(s) nos BK_{Ca} (Tang et al., 2001; Liu e Gutterman, 2002). A oxidação de resíduos de cisteína e metionina contribuem para a modulação dos BK_{Ca} . Tem sido proposto que a oxidação de resíduos de cisteína localizados no domínio intracelular e extracelular da região C-terminal, que têm alta afinidade para cátions divalentes como o Ca^{2+} , altera as propriedades do canal. A condutância iônica de outros subtipos de canais de

K^+ , como os K_v e o K_{ATP} (canais de K^+ sensíveis ao ATP; trifosfato de adenosina), também pode ser modulada através da ação das EROs (Liu e Gutterman, 2002).

Como exemplo de S-nitrosotióis endógenos temos a S-nitrosoalbumina, GSNO e a S-nitrocisteína (Richardson e Benjamin, 2002). Em comparação ao NO, os S-nitrosotióis são compostos mais estáveis, sendo que alguns apresentam meia-vida acima de 40 minutos (Gaston, 1999) e, eventualmente, de horas ou até mesmo dias. Os S-nitrosotióis também apresentam-se na forma exógena ou sintética.

A partir dos anos 80, o grande interesse pelo conhecimento dos efeitos do NO em sistemas biológicos, especialmente no sistema cardiovascular, estimulou o desenvolvimento da química sintética de vários doadores de NO. Muitos destes doadores são utilizados na clínica há várias décadas, como por exemplo o GTN e o SNP (Ignarro et al., 2002). O GTN tem sido utilizado na profilaxia e no tratamento da angina de peito, outras doenças coronarianas, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva. Já o SNP aplica-se a casos de emergências, para o tratamento da hipertensão e falência cardíaca severa. A eficácia terapêutica destes agentes está relacionada a vasodilatação venosa e arterial periférica e a diminuição do consumo de O_2 pelo miocárdio. Em comum, os nitratos apresentam efeitos de início rápido e, com o uso crônico destes agentes desenvolve-se tolerância, um fenômeno vascular ligado à baixa eficácia terapêutica da droga e a hipersensibilidade a vasoconstritores. Entre os mecanismos indutores do efeito de tolerância ao GTN encontram-se: a diminuição da expressão da eNOS e biodisponibilidade de co-fatores, aumento da produção de O_2^- e $ONOO^-$, dessensibilização da guanilato ciclase solúvel e alteração do processo de liberação do NO pelo GTN. Segundo Chen, Zhang e Stamler (2002), o efeito de tolerância aos nitratos está associado a diminuição da biotransformação do GTN e, formação do 1,2-gliceril dinitrato e NO_2^- , catalisado pela nitrato redutase, a aldeído dehidrogenase mitocondrial, apontada como a principal enzima responsável pelo metabolismo do GTN. Todavia, em ensaios *in vivo* e *in vitro* constata-se também o envolvimento do estresse oxidativo no efeito de tolerância aos

nitratos (Al-sa'doni e Ferro, 2000; Münzel, 2001; Fayers et al., 2003). Assim, o tratamento vascular com a vitamina C previne o desenvolvimento da tolerância (Hanspal, et al., 2002).

A utilização de doadores de NO em modelos experimentais permite, por exemplo, mimetizar a produção enzimática de NO e viabilizar estudos com os diferentes estados redox do NO. É importante ressaltar que, os doadores de NO são agentes farmacológicos que apresentam o grupo funcional nitroso ou nitrosil (Ignarro et al., 2002). Estes compostos sintéticos são divididos em diferentes grupos que incluem os nitratos orgânicos (*ex.g.*, GTN), nitritos orgânicos (*ex.g.*, nitrito de isoamila), nitrosos inorgânicos (SNP), sidnoniminas (3-morfolinil sidnonimina; SIN-1) e os S-nitrosotióis (Feelisch, 1998). A classe de nitrovasodilatadores, nitratos e nitritos orgânicos são pró-drogas que geram o NO bioativo através do metabolismo enzimático. Já o SNP apresenta um grupo nitrosil ligado ao ferro (formando um complexo bipyramidal) e liberação espontânea em pH fisiológico. Já as sidnoniminas apresentam decomposição espontânea em NO^\cdot e O_2^- em pH fisiológico. Por sua vez, os S-nitrosotióis pertencem a uma classe de doadores diretos de NO que liberam NO^+ espontaneamente (Ignarro et al., 2002). Muitos S-nitrosotióis, como o SNAP, são sintetizados a partir da reação de moléculas precursoras de tiol e nitrito acidificado ($\text{HNO}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}^+ + \text{H}_2\text{O}$; $\text{RSH} + \text{NO}^+ \rightarrow \text{RSNO} + \text{H}^+$) (Hogg, 2000).

Estes compostos doadores de NO variam quanto a cinética de liberação do NO e a necessidade ou não de metabolização para a liberação do NO. Além disso, os S-nitrosotióis exógenos são substâncias sólidas que permanecem estáveis ou relativamente estáveis por longos períodos de estocagem (Soullere et al., 2001). Já em solução aquosa, os S-nitrosotióis são considerados instáveis (Arnelle e Stamler et al., 1995), e a razão de decomposição destes compostos depende, em grande parte, das características químicas da estrutura associada ao NO (Soullere et al., 2001). Entre os S-nitrosotióis incluem-se o SNAP, GSNO, S-nitrocaptopril, S-nitrosocisteína e a S-nitrosohemoglobina, que particularmente exercem um papel importante na regulação do fluxo sanguíneo mediante a liberação do NO (Wang et al., 2000). Entre estes doadores de NO,

o SNAP é um composto freqüentemente utilizado em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (Nelson et al., 2003). Estudos de cinética realizados com espectrofotometria determinaram que o SNAP possui uma decomposição lenta, com meia-vida em torno de 3 horas, em condições isentas de íons metais. Segundo Soulere colaboradores (2001), a forma redox liberada pelo SNAP é o NO^\cdot , que pode receber um elétron livre, formando o NO^+ ($\text{NO}^\cdot \rightarrow \text{NO}^+ + e^-$), ou em solução aquosa tampão o NO^\cdot pode reagir com H_2O , originando o ácido nitroso (HNO_2) ($\text{NO}^\cdot + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HNO}_2 + \text{H}^+ + e^-$).

1.2. Seps, seps severa e choque séptico

A seps, a seps severa e o choque séptico são síndromes clínicas heterogêneas decorrentes de um processo inflamatório sistêmico que representa uma das maiores causas de morte em Unidades de Terapia Intensiva. Estima-se que 750.000 casos ocorram por ano nos Estados Unidos (Anel e Kumar, et al., 2001), atingindo uma taxa de mortalidade de 30 a 50 % (Sands et al., 1997; Cohen, 2002).

Em 1991, o *American College of Chest Physicians* e a *Society of Critical Care Medicine* realizaram uma conferência de consenso internacional de seps estabelecendo padronizações de termos, definições, critérios de diagnóstico da resposta inflamatória sistêmica, monitoramento e intervenções terapêuticas. Neste consenso, a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) foi definida como sendo a ativação sistêmica da resposta imune inata ocasionada por processos não-infecciosos e infecciosos. A SRIS pode ser desencadeada por trauma, dano térmico, pancreatite e outros processos inflamatórios estéreis e, mais freqüentemente, por infecção por microorganismos.

Neste consenso internacional, a seps foi definida como sendo uma SRIS associada a uma infecção, e a seps severa refere-se a própria seps associada a hipotensão, hipoperfusão e a disfunção múltipla de órgãos. A síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) representa a função alterada de órgãos, em que a homeostasia não pode ser mantida sem a intervenção clínica adequada. Já o termo choque séptico é designado para os

casos de sepse associados a um quadro de hipotensão arterial, o qual requer a administração de fluidos (Levy et al., 2003). O choque séptico representa a forma mais grave da SRIS e está presente em 25 % dos casos de sepse (Sands et al., 1997). Em geral, a sepse é decorrente da invasão do sangue por fungos, vírus, parasitas e, principalmente por bactérias (Parrillo, 1993). Os microorganismos e as endotoxinas isoladas ativam o sistema de defesa do organismo, através do sistema humoral (sistema complemento e sistema de coagulação) e dos componentes celulares, como os monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais (Marsh e Wewer, 1996), linfócitos e fibroblastos (Beishuizen et al., 1998). Admite-se que a excessiva ativação do sistema complemento estimula a destruição tecidual na sepse e, os componentes C3, C3a e C5 foram indicados como alvos de possíveis estratégias terapêuticas para o controle da resposta inflamatória sistêmica presente nesta patologia. Já a ativação do sistema de coagulação (via intrínseca e extrínseca) acarreta o depósito intravascular de fibrina, coagulação intravascular disseminada (CID), trombozes, diminuição dos níveis de antitrombina e proteínas C e S na sepse (Arrieta et al., 2000).

Com relação aos componentes celulares, as células ativadas liberam diversos mediadores que amplificam a resposta inflamatória (Marsh e Wewer, 1996). Na endotoxemia, parte da produção e da atividade de citocinas pró-inflamatórias são antagonizadas por citocinas anti-inflamatórias. Na resposta antiinflamatória destaca-se a participação de alguns agentes como a IL-1-RA, IL-4, IL-10 e IL-13 e, nos eventos pró-inflamatórios associa-se a IL-1 β , TNF- α e a IL-8, entre vários outros mediadores (Klosterhalfen e Bhardwaj, 1998; Beishuizen et al., 1998). Recentemente, estudos evidenciaram que o NO altera a adesão de neutrófilos em células endoteliais e a migração de neutrófilos para o tecido extravascular, após a administração de citocinas e no modelo de CLP (ligadura e perfuração do ceco) em camundongos. Na endotoxemia e em outras condições infecciosas, a migração de neutrófilos corresponde a um fenômeno importante para o controle disseminação bacteriana (Tavares-Murta et al., 1998; Benjamin et al., 2000).

A complexa interação dos mediadores inflamatórios produz profundas alterações fisiopatológicas na sepse, culminando na SDMO. Entre estas alterações destacam-se: i) o direto efeito citotóxico dos mediadores liberados durante o processo inflamatório generalizado e ii) a falência do sistema circulatório que gera o déficit de O₂ tecidual (Parrillo, 1993; Beal e Cerra, 1994). Em processos inflamatórios, e especialmente na sepse, os neutrófilos ativados liberam mediadores citotóxicos que contribuem para o dano tecidual. Entre estes produtos encontram-se proteases, citocinas e EROs. Trabalhos recentes mostraram que a produção de EROs está associada a importantes danos oxidativos e, concomitante depressão das defesas antioxidantes do organismo durante a sepse e o choque séptico.

Na sepse, os distúrbios cardiovasculares incluem a disfunção cardíaca e a alteração do tônus vascular (Wolkow, 1998). A disfunção cardíaca manifesta-se primeiramente através da taquicardia, decorrente de um mecanismo fisiológico e adaptativo ao distúrbio vascular. Em uma segunda fase, a taquicardia é substituída por uma depressão cardíaca, que esta associada a produção de mediadores que reduzem a performance cardíaca (Parrillo, 1993, Corda et al., 1998). Estudos demonstram que a exposição de miócitos ao LPS causa o aumento de NO via iNOS, que deprime a liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático, reduzindo a atividade β -adrenérgica por uma via dependente de GMPc. Assim, o NO contribui para limitar a resposta β -adrenérgica em casos de cardiomiopatias, como na falência aguda do miocárdio (Ziolo et al., 2001). Outros estudos têm demonstrado que após a exposição as citocinas pró-inflamatórias, doses moderadas e altas de inibidores de iNOS restauram e prejudicam a contratilidade do miocárdio, respectivamente, indicando que baixas concentrações de NO são necessárias para a manutenção da contração cardíaca (Vincent et al., 2000). Além disso, a função cardiovascular é diretamente influenciada pela ação de vários outros mediadores gerados fisiologicamente e, também em resposta a endotoxina na sepse. Dentre estas substâncias vasoativas destaca-se as catecolaminas, histamina, 5-hidroxitriptamina (serotonina), peptídeos opióides, cininas, prostaglandinas, tromboxano, leucotrienos, angiotensina e EROs (Parratt, 1998).

Sabe-se também que na sepse, a alteração vascular compreende na diminuição da resistência vascular e na hipotensão severa, sendo que ambos os efeitos estão associados ao fenômeno vascular caracterizado como hiporeatividade a vasoconstritores (Thiemermann, 1997). Por outro lado, apesar da existência da vasodilatação generalizada na sepse, ocorre também importante vasoconstrição nos sistemas renal (Boffa e Arendshorst, 2005) e intestinal (Diaconu et al., 1995). Estas modificações da homeostasia vascular na sepse decorrem do desequilíbrio endógeno da produção local e/ou sistêmica de vasodilatadores (como por exemplo, o NO e prostaglandinas) e vasoconstritores [p.ex. catecolaminas, angiotensina II, fator ativador de plaquetas (PAF), tromboxano A₂ e endotelinas] (Hinshaw, 1996). Parte do desequilíbrio da produção destas substâncias vasoativas é consequência da severa disfunção endotelial na sepse, que contribui para o aumento da permeabilidade vascular, formação de edema e hipotensão (Vallet, 2003). A disfunção endotelial ocorre freqüentemente na sepse e, especialmente na microcirculação (Hinshaw, 1996). Com o propósito de avaliar a disfunção endotelial na sepse humana foram desenvolvidos métodos específicos para detecção de células endoteliais circulantes. Além disso, a própria administração de LPS tem sido descrita como uma técnica de lesão do endotélio. Em síntese, a disfunção endotelial favorece a agregação de leucócitos e plaquetas, coagulopatia, hipoperfusão, hipóxia tecidual, disfunção de órgãos e a mortalidade na sepse (Vallet, 2003).

Conforme abordado anteriormente, devido a correlação entre a sepse e a hiporeatividade a vasoconstritores, a comunidade científica têm investigado exaustivamente os mecanismos envolvidos neste evento vascular, principalmente através da utilização de modelos experimentais com LPS. Assim, a hiporeatividade a vasoconstritores tem sido observada em vasos expostos ao LPS e em vasos obtidos de animais endotoxêmicos (Julou-Schaeffer et al., 1990; Ho et al., 1996). Similarmente, a administração de LPS em ratos anestesiados causa significativa redução da resposta vasoconstritora e, conseqüente queda da pressão arterial (Szabo et al., 1993a). Outros estudos mostram que LPS reduz a resposta contrátil à noradrenalina (Julou-Schaeffer

et al., 1990), U46619, KCl (Ueno e Lee, 1993), fenilefrina (Ho et al., 1996) entre outros agonistas. Outrossim, na sepse avaliada através do modelo de CLP, estão presentes a hiporeatividade a agentes constritores (fenilefrina, serotonina e altas concentrações de K^+) e a hiperreatividade a agentes vasodilatadores (acetilcolina, A23187, L-arginina e GTN) em artéria mesentérica (Chen et al., 1994). Vários trabalhos demonstraram que esta hiporeatividade a vasoconstritores mediada pelo LPS é decorrente da expressão de iNOS e da acentuada produção de NO (Szabo et al., 1993a). A artéria mesentérica superior, renal, hepática e coronária são alguns exemplos de diferentes segmentos vasculares, nos quais a expressão da iNOS e as modificações da reatividade estão associadas ao LPS e ao NO (Piepot et al., 2002). Por outro lado, a hiporeatividade deflagrada pelo LPS e, concomitante expressão de iNOS, também estão presentes no leito venoso (Vayssettes-Courchay et al., 2003). No entanto, durante o choque séptico os vasos pertencentes a microcirculação (arteríolas, vênulas e capilares) são os mais afetados (Hinshaw, 1996). Em estudo do decurso temporal, a hiporeatividade às catecolaminas causada pelo LPS revelou duas fases distintas: a fase inicial (até uma hora após o LPS) e fase tardia (pelo menos 5 horas após o LPS). Em ambas as fases existe a participação do NO, sendo que na fase inicial o NO é liberado pelo endotélio e na fase tardia o NO é produzido em grande quantidade no músculo liso, resultante da expressão da iNOS (Paya et al., 1995a).

Nas duas últimas décadas o tratamento da sepse não foi substancialmente modificado, que consiste principalmente em combater a infecção e prestar suporte em caso de disfunção de órgãos, administrando fluidos e agentes inotrópicos e vasopressores (Feihl et al., 2001). Nos últimos anos, inúmeras cepas de bactérias, incluindo as gram-negativas, têm adquirido resistência a diversos antibióticos utilizados para o controle das infecções (Wyckoff et al., 1998). Como relação às substâncias vasopressoras, a dopamina, dobutamina, adrenalina, noradrenalina, fenilefrina (Quezado e Natanson, 1992) e o isoproterenol são exemplos de agentes utilizados na clínica nos estados de choque, com o propósito de manter os níveis adequados

de pressão arterial média e perfusão tecidual. Em processos fisiológicos, a adrenalina e a noradrenalina são catecolaminas liberadas a partir da medula adrenal em resposta direta ao aumento do tônus vascular e através de terminais do sistema nervoso simpático, respectivamente. Na sepse, a severa resposta simpatoadrenal ocorre de forma rápida e transitória e, desempenha um importante papel nas alterações metabólicas durante a fase aguda desta patologia (Beishuizen et al., 1998).

Várias pesquisas com o NO foram conduzidas em modelos experimentais com animais, tornando complexo o entendimento do papel do NO na sepse, e a interpretação de muitos estudos aparentemente conflitantes. É importante ressaltar que, as condições dos ensaios podem variar de acordo com as espécies estudadas, os modelos empregados de endotoxemia, a concentração de NO e outros mediadores envolvidos, bem como o tempo das medidas e observações experimentais realizadas. Assim, a verificação das próprias adversidades dos estudos podem auxiliar na compreensão das controvérsias que cercam os efeitos das inúmeras drogas e a participação do NO na sepse. (Vincent et al., 2000). Seqüencialmente, descreve-se uma abordagem sucinta de alguns importantes resultados em circunstâncias experimentais e clínicas obtidos na área de NO e sepse. Vários estudos têm analisado o efeito de antiinflamatórios esteroidais e não-esteroidais como alternativas de tratamento durante a fase inicial e a fase tardia da hiporeatividade a vasoconstritores induzida pelo LPS. Assim, o pré-tratamento de ratos endotoxêmicos com indometacina atenua a hiporeatividade vascular (Szabo et al., 1993b). No entanto, a indometacina abrande as alterações hemodinâmicas na fase inicial, mas não na fase tardia após o LPS (Fatehi-Hassanabad et al., 1996). Foram também encontrados resultados promissores em relação a resposta endotoxêmica em camundongos *knockout* para COX-2 (COX; ciclooxigenase), como o aumento da sobrevivência e a redução da infiltração de neutrófilos nos rins e pulmões, em parte, pelo aumento de IL-10 (Ejima et al., 2003). Já os glicocorticóides podem ser uma das principais classes de drogas usadas no tratamento da sepse, se administrados antes da instalação do quadro. Os glicocorticóides são potentes inibidores da expressão

da iNOS *in vitro* e *in vivo*, através da formação de anexina 1 nas superfícies celulares (Wu et al., 1995c). Paya e colaboradores (1993a), descreveram que nas fases iniciais da endotoxemia em ratos, a dexametasona previne a hiporeatividade vascular, porém não reverte este efeito vascular, uma vez estabelecido na fase tardia do choque endotóxico. O uso de baixas doses de glicocorticóides atenua significativamente a hipotensão, hiporeatividade vascular, taquicardia e a disfunção renal em ratos tratados com LPS, em parte, pela redução da produção endógena de NO (Tsao et al., 2004). Investigações recentes revelaram que a ação benéfica da dexametasona na endoxemia está associada à atividade sobre os canais de K^+ , e especialmente os K_{ATP} (d'Emmanuele di Villa Bianca et al., 2003). A própria administração de pequenas doses de LPS em ratos induz tolerância cardiovascular à endotoxemia, a qual está relacionada ao aumento dos níveis endógenos de glicocorticóides e, concomitante diminuição da expressão da iNOS, que em última análise, reduz a hipotensão e a hiporeatividade a vasoconstritores (Szabo et al., 1994b). Estudos relacionados à terapia antiinflamatória revelam que anticorpo anti-TNF, IL-1-RA e a IL-10 podem ser benéficos na fase inicial da SRIS. Em contraste, a administração de citocinas próinflamatórias (e.g. IFN- γ e TNF- α) auxiliam na fase de imunossupressão da endotoxemia (Klosterhalfen e Bhardwaj, 1998).

Por outro lado, a utilização de inibidores da iNOS restaura a hipotensão e a hiporeatividade a vasoconstritor e aumenta a sobrevivência de roedores endotoxêmicos (Szabo et al., 1994a), prevenindo a hipotensão e a redução da resposta contrátil a vasoconstritor em até 180 min após a administração de LPS em ratos anestesiados (Wu et al., 1995b). Neste contexto, a inibição da iNOS previne o colapso do sistema cardiovascular e a disfunção de órgãos (Ruetten et al., 1996a) e aumenta a sobrevivência de animais (Vincent et al., 2000). Em modelo *in vitro* de endotoxemia, a inibição da iNOS com um análogo de THB₄ ameniza a diminuição da resposta a agentes vasopressores (Gibraeil et al., 2000). Outros estudos demonstram a relação entre a administração de inibidores de NOS e o aumento da mortalidade de animais endotoxêmicos. Em parte, as diferenças entre estes efeitos estão associadas aos modelos de

endotoxemia, a dose utilizada dos inibidores e a fase da sepse em que foram realizados os tratamentos. Por exemplo, a expressão da iNOS ocorre até 6 horas após a endotoxina e, a administração precoce de inibidores de NOS favorecem o aumento da mortalidade dos animais, em parte, associado a inibição do efeito protetor do NO sintetizado pela eNOS (Vincent et al., 2000). Dados preliminares em experimentos clínicos indicam que os inibidores não-seletivos de NOS, como por exemplo o N^ω-metil-L-arginina (L-NMMA), exercem efeitos hemodinâmicos benéficos (Thiemermann, 1997). Na sepse severa em humanos, a administração de L-NMMA causa aumento da pressão arterial e resistência vascular sistêmica com falência da frequência cardíaca, que pode comprometer a perfusão tecidual (Petros et al., 1994). Ademais, em condições endotoxêmicas, a inibição do efeito da produção do NO implica no comprometimento de importantes funções citoprotetoras, que incluem a prevenção de trombose microvascular, inibição da agregação plaquetária e adesão de leucócitos, modulação da atividade do sistema simpático e broncodilatação (Parratt, 1998). Investigações recentes sugerem uma possível estratégia de tratamento da sepse, com o uso de inibidor seletivo da dimerização da iNOS (BBS-2) que reduz a hipotensão sistêmica, os níveis de NO₂⁻ e NO₃⁻ e a disfunção cardíaca (Ichinose et al., 2003). Na tentativa de reverter a hiporeatividade através da redução dos níveis deletérios de NO endógeno, foram realizadas pesquisas com um agente sequestrador de NO, assim, a hemoglobina humana aumentou a capacidade contrátil de vasos tratados com LPS (Kim et al., 2001).

Estudos experimentais envolvendo animais endotoxêmicos demonstraram que o azul de metileno reverte a hipotensão e hiporeatividade a vasoconstritores (Keaney et al., 1994, Wu et al., 1998), e reduz a hipertensão e o edema pulmonar (Evgenov et al., 2002). Gachot e colaboradores (1995) reportaram que o azul de metileno produz aumento da pressão pulmonar arterial média. Já em estudos clínicos com pacientes em choque séptico por mais de 24 horas, o azul de metileno foi eficaz em reduzir a disfunção cardíaca e diminuir a necessidade de suporte adrenérgico, em comparação aos tratamentos convencionais a esta patologia. Por outro lado, estes efeitos

benéficos demonstraram-se transitórios após a suspensão da infusão desta droga. Estes dados sugerem a possibilidade da utilização da contínua infusão de azul de metileno na clínica, como um tratamento auxiliar no choque séptico (Kirov et al., 2001), porém, novos estudos deverão ser efetuados para tal comprovação (Gachot et al., 1995). Em modelo *in vivo* de sepse severa, o ODO (1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a-quinoxalin-1) aumentou a sobrevivência de camundongos, quando administrado antes ou 4 horas após o LPS (Zingarelli et al., 1999). Estas investigações indicam que a inibição da ativação contínua da guanilato ciclase solúvel, durante o sepse é importante alvo para a reversão do quadro clínico desta patologia.

A administração de LPS causa redução da concentração plasmática de vitamina C (um agente antioxidante) e comprometimento da performance vascular frente à ação de agentes vasoativos. Por outro lado, a co-administração de vitamina C com o LPS reverte a redução da resposta contrátil à noradrenalina e angiotensina II. Neste contexto, o estresse oxidativo pode ser um importante alvo na disfunção hemodinâmica em processos inflamatórios (Pleiner et al., 2003).

Os inibidores da tirosina quinase bloqueiam o quadro de hipotensão de longa duração e a hiporeatividade à noradrenalina causada pelo LPS (Bermejo et al., 2003). Estudos com agonista β_2 -adrenérgico demonstraram inibição da hipotensão e hiporeatividade vascular em ratos tratados com LPS e, aumento da sobrevivência de camundongos no modelo de sepse severa (Wu et al., 2000). A alteração hemodinâmica inicial produzida pelo LPS em ratos anestesiados foi parcialmente reduzida com o uso de HOE 140, um antagonista de receptores B_2 para bradicinina, evidenciando a participação deste mediador como um componente adicional à atividade do NO (Paya e Stoclet, 1995b). Os antagonistas de Ca^{2+} , o 1,4-dihidropiridina e o amlodipina, previnem a hiporeatividade vascular em ratos tratados com LPS obtido a partir de *Salmonella typhosa* (Salomone et al., 1998). Outras pesquisas identificaram vários compostos com efeitos benéficos na terapia da sepse, os quais estão em diferentes fases de estudos pré-clínicos e clínicos, com o uso de melatonina, inibidores de proteases, antagonistas de vasopressina, inibidores

de ECA (enzima conversora de angiotensina), antagonistas opióides, inibidores de adesão de leucócitos e inibidores de componentes do sistema complemento (Arrieta et al., 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O propósito do presente estudo foi investigar a modulação das respostas vasculares mediadas pelo óxido nítrico: hiporeatividade a vasoconstritor e relaxamento induzido por tióis.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em estudos *in vitro* em anéis de aorta de rato:

1- Avaliar a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP na presença e na ausência do endotélio.

2- Investigar a participação de mediadores derivados do endotélio na redução da hiporeatividade à fenilefrina associada a exposição vascular ao SNAP. Estes resultados originaram a seguinte publicação:

TERLUK, MR; SILVA, EDC; ANTUNES, TT; ASSREUY, J. The presence of the endothelial layer reduces nitric oxide-mediated hyporesponsiveness to phenylephrine in rat aorta. *Endothelium*. 2004, 1, 181-187.

3- Investigar o efeito de agentes oxidantes e redutores sobre a hiporeatividade à fenilefrina mediada por doadores de NO;

4- Pesquisar a correlação entre os efeitos produzidos pelo SNAP: hiporeatividade à fenilefrina e o relaxamento promovido pela L-cisteína;

5- Estudar os mecanismos envolvidos e o curso temporal da ação de tióis em vasos expostos ao SNAP;

6- Examinar o efeito de agentes oxidantes sobre a ação mediada pela L-cisteína associada a pré-incubação de doadores de NO;

7- Verificar o efeito da L-cisteína sobre a hiporeatividade à fenilefrina produzida pelo SNAP;

8- Avaliar os possíveis mecanismos pelos quais o DTNB modifica o padrão de hiporeatividade à fenilfrina e o relaxamento para L-cisteína induzido pelo NO, tais como: a) a via de sinalização mediada pelo

GMPC; b) a atividade dos canais de K^+ , BK_{Ca} ; e c) o processo de vasorelaxamento;

9- Examinar o efeito do DTNB e da L-cisteína sobre as respostas contráteis não-adrenérgicas;

Em estudos *in vivo* de pressão arterial média de rato:

10- Avaliar o efeito do DTNB sobre a hiporeatividade à fenilefrina causada pelo SNAP em ratos anestesiados;

Em estudos *in vitro* e *ex vivo* em anéis de aorta de rato e *in vivo* de sobrevida de camundongos:

11- Estudar o efeito oxidante do DTNB em modelos de endotoxemia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos fêmeas e machos da espécie *Rattus norvegicus*, pertencentes à linhagem *Wistar*, com peso entre 200 a 250 g para fêmeas, e 250 a 300 g para machos. Foram também utilizados camundongos *Swiss* albinos, fêmeas, pesando entre 20 a 30 g. Nos ensaios de órgão isolado foram utilizados ratos machos e, os experimentos de pressão arterial foram conduzidos com machos e fêmeas. Já nos testes de sobrevivência foram utilizados camundongos. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central, CCB-UFSC, e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da UFSC, em gaiolas contendo serragem, em sala com temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro (12/12 horas) e acesso livre à água e à ração. As normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do *General Guidelines for the Use of Animals in Scientific Research - National Institutes of Health (NIH - USA)* foram seguidas para a realização dos experimentos, e o presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFSC), sob o número 23080.007732/2003-34.

3.2. MODELOS EXPERIMENTAIS

3.2.1. Preparação de anéis de aorta de rato

Para obtenção das preparações de anéis de aorta torácica de rato, os animais foram sacrificados através de deslocamento e secção parcial da região cervical para execução do procedimento cirúrgico. Este procedimento consistiu na abertura da cavidade torácica, e retirada de um segmento da artéria aorta descendente torácica de 3 a 4 cm, a partir do diafragma até aproximadamente o arco aórtico. Seqüencialmente, o segmento aórtico foi transferido e acondicionado em líquido nutritivo sobre uma placa de Petri para a retirada dos tecidos adjacentes, e corte transversal do segmento em anéis de 3 a 4 mm de comprimento. Posteriormente, os anéis foram fixados em suporte de acrílico e haste metálica, e transferidos para cubas de vidro (5 ml) contendo líquido

nutritivo de Krebs-Henseleit modificado, aquecido à $\pm 37^{\circ}\text{C}$ e aerado com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2). Os anéis foram individualmente tracionados e mantidos sob tensão basal constante de 1 g. Os procedimentos de obtenção e montagem dos anéis no sistema de órgão isolado foram realizados cuidadosamente para preservação da camada endotelial, exceto em alguns experimentos, em que a camada endotelial foi intencionalmente removida com a inserção de uma haste metálica na luz do vaso, e cuidadosa fricção das preparações sob um papel filtro umedecido com líquido nutritivo. Na fase inicial de todos os experimentos, as preparações foram primeiramente submetidas a um período de equilíbrio de 60 min, com substituição de líquido nutritivo a cada 15 min, e reajuste da tensão basal dos vasos para a tensão de 1 g quando necessário. Ao final deste período de equilíbrio, as preparações foram submetidas a uma avaliação farmacológica da presença funcional ou ausência da camada endotelial, através da verificação do efeito da acetilcolina ($1\text{ }\mu\text{M}$) em vaso pré-contráído com fenilefrina ($10\text{ }\mu\text{M}$). Este protocolo consistia na adição e incubação da acetilcolina por 5 min e, posterior avaliação da porcentagem de relaxamento da tensão contrátil da preparação. Assim, as preparações que apresentaram valor de relaxamento igual ou superior de 80% foram consideradas como anéis com endotélio, e os anéis que apresentaram valor de relaxamento igual ou inferior a 5% foram considerados como anéis sem endotélio. Esta avaliação experimental foi realizada de acordo com os procedimentos descritos previamente por Furchgott e Zawadski (1980).

O líquido nutritivo de Krebs-Henseleit modificado tem a seguinte composição: NaCl 118; KCl 4,7; KH_2PO_4 0,9; MgSO_4 1,1; CaCl_2 2,5; NaHCO_3 25, D-glucose 11 (mM) e EGTA $0,1\text{ }\mu\text{M}$. De acordo com o protocolo experimental, o líquido nutritivo recebeu a adição de indometacina ($10\text{ }\mu\text{M}$) e/ou dexametasona ($0,1\text{ }\mu\text{M}$). O EGTA foi adicionado para quelar cátions divalentes (Nasu et al., 2001). A dexametasona foi adicionada ao líquido nutritivo para inibir a expressão da iNOS (Rees et al., 1990) e da COX-2 (Masferrer e Seibert, 1994; Mitchell et al., 1993), decorrente da presença de LPS contaminante nos ensaios. Já a indometacina foi acrescentada ao líquido nutritivo para prevenir a

formação de prostanóides (Vane, 1978). O líquido nutritivo foi ajustado para pH 7,4 com a adição de ácido acético (10%).

As modificações do tônus vascular foram detectadas por transdutores de força isométrica (Grass-Telefactor; Modelo F-03; U.S.A.) e registradas através de sistema operacional e de integração de software: Windows 98TM (Microsoft Corporation, USA) e Digi-Med[®] (*Digi-Med[®] Tissue Force AnalyserTM*, Versão 1.01, Modelo 210, e *Digi-Med[®] System IntegratorTM*, Versão 1.07, Modelo 210, USA).

3.2.2. Medida da pressão arterial média em ratos anestesiados

Os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg) através da via intramuscular (*i.m.*) e, doses de reforço foram administradas durante os experimentos, uma hora após (30 e 7 mg/Kg; *i.m.* de ketamina e xilazina, respectivamente) conforme utilizado previamente por Gratton e colaboradores (1995) e Silva-Santos e Assreuy (1999). Imediatamente após a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em mesa cirúrgica, contendo sistema de aquecimento para manter a temperatura corporal dos animais a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante o experimento. Seqüencialmente, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico que consistiu na implantação de três cânulas de polietileno: uma na traquéia (PE), e as outras duas, na veia femoral esquerda (PE 20) e na artéria carótida direita (PE 50). Após a canulação da veia femoral, 30 UI de heparina sódica, um anticoagulante, foi administrado com 100 µl de solução salina fosfato tamponada, segundo a formulação de Dulbecco (PBS, composto em mM: NaCl 137, KCl 2,7, KH₂PO₄ 1,5, NaHPO₄ 8,1; pH 7,4). O acesso da traquéia foi instalado para auxílio da respiração espontânea dos animais. Já os acessos vasculares permitiram as administrações de drogas e os registros da pressão arterial média. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em período de estabilização durante 20 min. Os animais foram sacrificados pela administração intravenosa de xilocaína em altas doses. Os valores da pressão arterial média foram registrados através de sistema operacional e de integração de software: Windows 98TM (Microsoft Corporation, USA) e Digi-Med[®] (*Digi-*

Med[®] Blood Pressure AnalyserTM, Versão 1.10, Modelo 200, e *Digi-Med[®] System integratorTM*, Versão 1.15, Modelo 200, e USA).

3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.3.1. Efeito do SNAP sobre as contrações induzidas pela fenilefrina em anéis de aorta

O protocolo utilizado para avaliação do efeito do SNAP sobre as contrações induzidas pela fenilefrina, na presença e na ausência da camada endotelial, foi similar ao descrito por Terluk e colaboradores (2000). Trinta min após a avaliação experimental da presença ou da ausência de endotélio, foram construídas curvas concentração-resposta controle I (CCR I) à fenilefrina (0,1 nM a 100 μ M) em anéis de aorta com e sem endotélio. Seqüencialmente, as preparações foram lavadas, através de três substituições consecutivas de líquido nutritivo. Após 30 min, as preparações foram incubadas com o doador de NO, o SNAP (2, 20 e 200 μ M) durante 30 min. Ao término desta incubação foram realizadas novas trocas de líquido nutritivo para lavagem dos vasos. Sessenta min após, com trocas de líquido nutritivo a cada 15 min, procedia-se a construção de novas curvas para fenilefrina (CCR II; 0,1 nM a 100 μ M). Em outro grupo de experimentos, foram efetuadas curvas para fenilefrina (CCR I e CCR II; controle) em anéis incubados somente com PBS (100 μ l), nos mesmos intervalos de tempo do experimento descrito anteriormente. Cada preparação foi incubada com apenas uma única concentração de SNAP. A resposta máxima contrátil ($R_{m\acute{a}x}$) obtida em cada preparação através da CCR I (controle) foi considerada como sendo 100 % de contração, e a CCR II foi calculada proporcionalmente a esta porcentagem.

3.3.2. Análise dos mecanismos envolvidos na hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta

Para avaliar o possível envolvimento da produção de mediadores derivados do endotélio na redução da ação do SNAP sobre a hiporeatividade à fenilefrina, foi utilizado os seguintes compostos: a) superóxido dismutase (SOD;

100 UI/ml; enzima que catalisa a conversão do O_2^- a H_2O_2 e O_2 ; b) MnTBAP (100 μ M; SOD mimético e sequestrador de $ONOO^-$); c) MK 886 (10 μ M; inibidor de lipooxigenase), d) BQ123 (1 μ M; antagonista de receptor ET-A); e) clotrimazol (10 μ M; inibidor de citocromo P-450 e bloqueador de IK_{Ca}) e f) captopril (10 μ M; inibidor da ECA). Neste protocolo, os compostos utilizados foram administrados isoladamente em diferentes grupos de vasos com endotélio. Assim, os anéis foram pré-tratados com os compostos por 10 min e, na presença do composto foram construídas as CCR I e as CCR II, com um intervalo de 120 min entre estas curvas. Trinta min após a CCR I, os anéis foram tratados com SNAP (200 μ M) ou PBS (100 μ l) durante 30 min. Na seqüência dos experimentos, as CCR II foram registradas 60 min após a incubação com SNAP ou PBS. Em outra série de experimentos, a CCR I e a CCR II para fenilefrina foram avaliadas em preparações incubadas somente com PBS (100 μ l) na presença e na ausência destes compostos. Em todos os experimentos descritos acima e nos itens 3.3.1., 3.3.2. e 3.3.3. o líquido nutritivo recebeu a adição de indometacina (10 μ M), um inibidor de COX-1 e COX-2 (Mitchell et al., 1993).

3.3.3. Efeito do SNAP sobre o relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta

A fim de avaliar a correlação entre a possível redução da atividade da eNOS e a diminuição da hiporeatividade à fenilefrina induzida pelo SNAP na presença do endotélio foi empregado o seguinte experimento: as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina (10 μ M) 30 min após a avaliação da presença endotelial nos vasos em estudo. Seqüencialmente, procedeu-se a realização de uma CCR I para acetilcolina (1 nM a 100 μ M). Trinta min após a CCR I e lavagem das preparações, os vasos foram incubados por 30 min com SNAP (200 μ M) ou PBS (100 μ l) em experimento controle. Sessenta min após, uma nova curva para acetilcolina (CCR II; 1 nM a 100 μ M) foi obtida em vasos pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M). A $R_{m\acute{a}x}$ para fenilefrina obtida em cada preparação foi aplicada como sendo 100 % da contração, e a CCR II para a acetilcolina foi calculada proporcionalmente a este valor.

3.3.4. Efeito do DTNB sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP e GTN em anéis de aorta

Para investigar possível interferência do prévio efeito oxidante do DTNB (um agente que não atravessa as membranas celulares) na posterior instalação da hiporeatividade à fenilefrina mediada pelo SNAP e GTN, utilizou-se os experimentos descritos a seguir. Em anéis de aorta com e sem endotélio, 30 min após as CCR I (ou controle I) para fenilefrina (1 nM a 100 μ M), os anéis foram incubados com o agente oxidante DTNB durante 15 min. Posteriormente, construía-se as curvas para fenilefrina (CCR II; controle II). Trinta min após a CCR II, os anéis foram expostos durante 30 min ao SNAP (200 μ M; DTNB 10 e 100 μ M) ou GTN (200 μ M; DTNB 100 μ M). Decorridos 60 min, foram construídas novas curvas para fenilefrina (CCR III).

Com o propósito de verificar a possível reversibilidade da hiporeatividade à fenilefrina mediada pelo SNAP ou GTN após a instalação deste evento vascular, conduziu-se experimentos nos quais: o DTNB (100 μ M; 15 min) foi incubado somente antes da execução da CCR III para fenilefrina em anéis sem endotélio. Em protocolo adicional ao anterior, o agente redutor, ditioneitol (DTT; 200 μ M), foi incubado durante 15 min após o DTNB. Os experimentos controles estão descritos em conjunto com o item 3.3.5.

3.3.5. Efeito da diamida sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta

Com o objetivo de analisar a ação de outro agente oxidante sobre a hiporeatividade à fenilefrina causada pelo SNAP foram realizados ensaios com diamida. Em vasos com endotélio, após a construção da CCR I, a diamida (100 e 200 μ M; 15 min) foi adicionada às preparações, antes da execução da CCR II, ambas as curvas obtidas com a adição de 0,1 nM a 100 μ M de fenilefrina. Conforme intervalos experimentais descritos anteriormente, estes vasos foram incubados com SNAP (200 μ M) e, submetidos a CCR III para fenilefrina. Em outros ensaios, as CCR I, CCR II e CCR III para fenilefrina foram efetuadas em preparações expostas isoladamente ao DTNB, DTT,

SNAP, GTN, diamida e PBS (100 µl). Assim, foi possível medir a ação destes agentes sobre as respostas contráteis à fenilefrina durante o decorrer dos experimentos. Em todos os experimentos, ao final das incubações com DTNB, DTT, SNAP, GTN, diamida e PBS, os vasos foram rigorosamente lavados com líquido nutritivo para retirada destes agentes das cubas de perfusão.

3.3.6. Efeito do ditioneitol sobre a hiporeatividade à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta sem endotélio

Para examinar o efeito de um agente redutor sobre a hiporeatividade à fenilefrina mediada pelo SNAP foram elaborados alguns experimentos com o DTT em anéis de aorta sem endotélio. Trinta min após a CCR I, os anéis foram expostos ao SNAP (20 µM; 30 min), e uma hora após, os vasos foram incubados com DTT (100 µM) por 15 min. Em presença deste agente foram concluídas as CCR II para fenilefrina. Em grupos controles, as CCR II foram realizadas em vasos expostos somente ao DTT (100 µM; 15 min) ou PBS (100 µl).

3.3.7. Efeito da L-cisteína e N-acetilcisteína em anéis de aorta expostos a doadores de NO

Parte dos experimentos foram realizados segundo a descrição metodológica de Alencar et al. 2003a, com algumas modificações. Os ensaios descritos seqüencialmente visaram investigar: a) a mobilização de NO a partir de tióis, a L-cisteína e a N-acetilcisteína, em preparações pré-expostas ao SNAP ou GTN, medindo as repostas de vasorelaxamento; b) a correlação entre o vasorelaxamento mediado pela L-cisteína e a N-acetilcisteína com a hiporeatividade à fenilefrina produzidos pelo SNAP; c) a magnitude do vasorelaxamento na presença e na ausência de endotélio; d) o efeito oxidante do DTNB e da diamida sobre o vasorelaxamento produzido pela L-cisteína, em anéis previamente incubados com SNAP; e) a reversão do efeito oxidante do DTNB através do DTT sobre o efeito da L-cisteína associado a ação do SNAP; f) a duração do vasorelaxamento induzido pela L-cisteína em vasos pré-

incubados com SNAP; e g) a possível reversão da hiporeatividade à fenilefrina induzida pelo SNAP, através de várias exposições dos vasos à L-cisteína. Assim, em anéis com e sem endotélio foram construídas CCR I e CCR II para fenilefrina, com intervalo de 30 min entre as curvas, conforme descrito anteriormente. Trinta min após a CCR II, procedia-se a adição de SNAP (200 μ M) ou PBS (100 μ l) durante 30 min nas cubas de perfusão. Sessenta min após, os vasos foram submetidos a concentrações crescentes de fenilefrina (1 nM a 100 μ M) para a indução de uma contração submáxima, em torno de 0,5 a 1 g de tensão. Em seguida, e sob as contrações submáximas das preparações, foram registradas as curvas (CCR III) para a L-cisteína (1, 10 e 100 μ M; 10 min; e, 1 a 300 μ M; 15 min) e a N-acetilcisteína (1 a 300 μ M; 15 min). Em experimentos complementares, 60 min após a exposição dos vasos com endotélio ao SNAP ou PBS foram executadas as CCR III para L-cisteína (1, 10 e 100 μ M), e na seqüência, mais seis curvas para L-cisteína foram obtidas em vários intervalos de tempo (90, 120, 150, 180, 210 e 240 min). Em outros registros, as preparações foram submetidas à nova curva para fenilefrina (CCR X; 0,1 nM a 100 μ M), 30 min após todas as CCR para L-cisteína (270 min após o SNAP ou o PBS). Nestes experimentos, os anéis foram mantidos em líquido nutritivo contendo L-NAME (100 μ M), um inibidor não-seletivo de NOS, a fim de evitar a produção de NO pela eNOS durante os experimentos.

3.3.8. Efeito do DTNB sobre a resposta induzida por L-cisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP e GTN e pré-contraídos com fenilefrina

Conforme metodologia descrita anteriormente, em vasos com e sem endotélio, foram construídas curvas para fenilefrina (CCR I e CCR II; 0,1 nM a 100 μ M), antes e após a exposição dos vasos por 15 min ao DTNB (100 μ M), respectivamente. Trinta min após, seguiu-se a incubação com SNAP (200 μ M; 30 min). Decorridos 60 min, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (1 nM a 100 μ M) para a indução de tensão submáxima, em torno de 0,5 a 1 g. Em seguida, sob estas pré-contrações foram efetuadas as curvas para L-cisteína (CCR III; 1, 10 e 100 μ M; 10 min). Em alguns vasos com endotélio,

esta mesma seqüência experimental foi mantida e registrada, exceto que o SNAP foi substituído por GTN (200 μ M). Em outros experimentos, após a incubação do DTNB (100 μ M; 15 min) e execução das CCR-II para fenilefrina, vasos com e sem endotélio foram incubados durante 15 min com o DTT (200 μ M). Trinta min após, o protocolo experimental de exposição ao SNAP e, obtenção da CCR-III para L-cisteína foi seguido conforme descrito acima. Em outros grupos experimentais, as CCR III para L-cisteína foram obtidas em anéis expostos somente ao SNAP ou PBS (100 μ l). Em todos os ensaios e ao término das incubações com DTNB, DTT, SNAP e PBS, os vasos também foram lavados para retirada destes agentes das cubas de perfusão.

3.3.9. Efeito da diamida sobre a resposta induzida por L-cisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP e pré-contraídos com fenilefrina

Seguindo metodologia anterior, em vasos com endotélio, foram construídas curvas para fenilefrina (CCR I e CCR II), respectivamente, antes e após a incubação dos anéis com diamida (100 e 200 μ M; 15 min). Seguiu-se a exposição dos vasos ao SNAP (200 μ M) ou PBS (100 μ l) após 30 min. Depois de 60 min, os vasos foram pré-contraídos com fenilefrina (1 nM a 100 μ M) para a indução de tensão submáxima (0,5 a 1 g). Em seguida, sob estas pré-contrações foram efetuadas curvas para L-cisteína (CCR III; 1, 10 e 100 μ M; 10 min).

3.3.10. Efeito do DTNB sobre o relaxamento induzido por 8-Br-GMPc e NS1619 em anéis de aorta incubados com SNAP e pré-contraídos com fenilefrina

Para avaliar a possível interferência do DTNB na via de sinalização mediada pelo GMPc na hiporeatividade produzida pelo SNAP, foram realizados experimentos com 8-Br-GMPc, um análogo de GMPc, que atravessa as membranas celulares. Seguindo metodologia descrita anteriormente, após a construção da CCR-I e CCR-II para fenilefrina, ou seja, antes e após a exposição das preparações ao DTNB (100 μ M; 15 min), os anéis com endotélio foram submetidos a incubação com SNAP (200 μ M) durante 30 min. Sessenta

min após, as preparações foram expostas à crescentes concentrações de fenilefrina (1nM a 100 μ M) para obtenção da resposta contrátil submáxima, entre 0,5 e 1 g de tensão. Em seguida, sobre a contração submáxima para fenilefrina, foram administradas as concentrações de 1, 3, 10, 30 e 100 μ M de 8-Br-GMPc (CCR-III; 10 min). Em ensaios adicionais, os anéis foram incubados com DTNB durante 25 min, e a resposta para 8-Br-GMPc (CCR-III) foi avaliada. Em outros três grupos experimentais, foram executadas as CCR-III para 8-Br-GMPc em preparações expostas somente ao SNAP, DTNB ou PBS (100 μ l). Para avaliar o envolvimento dos BK_{Ca} no efeito produzido pelo DTNB na hiporeatividade obtida com SNAP, foram realizados ensaios com NS1619 (1, 3, 10, 30 e 100 μ M; 10 min; CCR-III), um abridor seletivo de BK_{Ca}, seguindo a metodologia descrita anteriormente para 8-Br-GMPc, incluindo os grupos experimentais para SNAP, DTNB e PBS (100 μ l).

3.3.11. Efeito do DTNB e do SNAP sobre as contrações induzidas por endotelina e as respostas produzidas por L-cisteína em anéis de aorta

Para examinar a ação do DTNB, do SNAP e da L-cisteína sobre as resposta contráteis não-adrenérgicas foram realizados experimentos com endotelina (ET-1). Em vasos com endotélio, a presente metodologia seguiu a seguinte seqüência: a) trinta min após a avaliação da presença de endotélio, os vasos foram incubados com DTNB (100 μ M) por 15 min; b) após novo intervalo de 30 min, procedeu-se a adição de SNAP (200 μ M) por 30 min, e lavagens da preparações ao término deste período; c) seguidos 60 min, os vasos foram contraídos com endotelina (ET-1; 1 μ M); d) sobre a contração promovida pela ET-1 foi adicionado à L-cisteína (1 a 300 μ M; 15 min). Em outros experimentos, foram obtidas curvas para ET-1 em vasos expostos somente ao DTNB, SNAP ou PBS (100 μ l).

3.3.12. Efeito do DTNB sobre o relaxamento induzido pelo SNAP em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina

Para examinar a suposta interferência do DTNB sobre o vasorelaxamento foram preparados os grupos de experimentos a seguir.

Conforme protocolo prévio, os anéis de aorta com endotélio foram submetidos a CCR I e CCR II para fenilefrina, antes e após a incubação com DTNB (100 μ M), respectivamente. Seguidos 30 min, foram adicionados nas cubas de perfusão, crescentes concentrações de fenilefrina (1 nM a 100 μ M) para indução de resposta contrátil média de 0,5 a 1 g de tensão. Sobre a resposta contrátil submáxima para fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-resposta para SNAP (1, 3, 10, 30, 100 e 300 nM; CCR-III; 10 min). Em outro grupo experimental, foram executadas as CCR-III para SNAP em preparações expostas somente ao PBS (100 μ l).

3.3.13. Efeito do DTNB em anéis de aorta incubados com SNAP e pré-contráídos com fenilefrina

Parte deste estudo analisou a possível mobilização de NO pelo DTNB em preparações pré-incubadas com SNAP. Em vasos com endotélio, trinta min após as CCR I e CCR II para fenilefrina, os anéis com endotélio foram incubados com SNAP (200 μ M) ou PBS (100 μ l) por um período de 30 min. Sessenta min após, as preparações foram expostas a crescentes concentrações de fenilefrina (1 nM a 100 μ M) para obtenção da resposta contrátil entre 0,5 e 1 g de tensão. Em seguida, sobre a contração submáxima para o agonista, foram administradas as concentrações de 1, 10 e 100 μ M de DTNB (CCR III; 10 min) ou adicionado PBS.

3.3.14. Efeito do DTNB sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em ratos anestesiados

Para estudar se os efeitos do DTNB sobre a hiporeatividade à fenilefrina produzida pelo SNAP *in vitro*, corroboram com os experimentos *in vivo*, foram realizadas investigações com o modelo de medida da pressão arterial média em ratos anestesiados. Os animais foram preparados para o registro da pressão arterial média, e após o período de estabilização, curvas dose-resposta controle I para fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg; intravenosa; *i.v.*; CDR I) foram obtidas. Após um novo período de estabilização da pressão arterial média (15 min), os animais receberam infusão de SNAP (85 nmol/Kg/min; *i.v.*)

durante 30 min. Trinta min após o SNAP, foram realizadas novas curvas para fenilefrina (CCR II). Em alguns ensaios, os animais foram exclusivamente tratados com DTNB (63 μ mol/Kg; *i.v.*) ou PBS (300 μ l) após a construção da CCR I ou antes da CCR II.

3.3.15. Efeito do DTNB sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo LPS em anéis de aorta

Com o propósito de investigar se o efeito do DTNB sobre a hiporeatividade à fenilefrina produzida por doadores de NO também ocorre em modelos endotoxêmicos, foram realizados experimentos *in vitro* e *ex vivo* utilizando o LPS. Os ensaios *in vitro* foram realizados segundo o protocolo experimental descrito previamente por Silva-Santos, Terluk e Assreuy (2002). De fato, a exposição vascular prolongada ao LPS promove a expressão da iNOS e a indução da hiporeatividade a vasoconstritor (Szabo et al., 1993a). A seqüência experimental consistiu na verificação da presença funcional da camada endotelial, conforme descrição anterior. Trinta min após este procedimento, as CCR I (controle I) para fenilefrina (1nM a 100 μ M) foram executadas. Depois, os anéis foram lavados com líquido nutritivo, e em seguida, foi realizada a incubação com LPS (10 μ g/ml) durante 8 horas. Em parte dos experimentos, a adição de LPS foi substituída por cicloheximida (um inibidor da síntese proteica; 10 μ M) e, estes anéis foram obtidos como grupo controle. Mais especificamente, a cicloheximida foi utilizada para prevenir a expressão de iNOS estimulada pela possível presença de LPS no líquido nutritivo e nas cubas de perfusão (Rees et al., 1990). Oito horas após a incubação de LPS ou cicloheximida, os vasos foram lavados com líquido nutritivo e, novas CCR para fenilefrina (CCR II) foram construídas. Após um novo período de equilíbrio (30 min), os vasos foram incubados com o DTNB (10 e 100 μ M) durante 15 min e, em seguida, novas trocas de líquido nutritivo foram efetuadas. Consecutivamente, outra curva para fenilefrina foi realizada (CCR III). Com relação ao protocolo *ex vivo*, os animais foram tratados com LPS (5 e 12,5 mg/Kg) ou PBS (200 μ l; para o grupo controle) pela via intraperitoneal (*i.p.*). Ademais, 4 e 6 horas após os respectivos tratamentos,

parte dos animais foram submetidos ao co-tratamento com DTNB (12,5 mg/Kg) pela via subcutânea (s.c.). Oito horas após os tratamentos com LPS ou PBS, os animais foram sacrificados e, os anéis de aorta foram montados para registro, conforme citado antecipadamente. Após, o protocolo experimental foi realizado conforme a descrição: a) a estabilização das preparações por 30 min; b) a verificação da ausência de endotélio, conforme já descrito; e c) construção da CCR I para fenilefrina (1nM a 100 μ M). Em outra série de experimentos, os vasos obtidos de animais somente tratados com LPS foram submetidos a incubação com DTNB (100 μ M; 15 min) e, em seguida, nova CCR para fenilefrina (CCR II) foi feita.

3.3.16. Efeito do DTNB sobre a mortalidade de animais endotoxêmicos

A indução do choque endotoxêmico em camundongos foi realizada através da administração de *Escherichia coli* viável (*E. coli*; 1×10^9 unidades/animal; *i.p.*). Os grupos de animais receberam os seguintes tratamentos: 1) 1×10^9 *E. coli* (T0; tratados na 0 hora); 2) 1×10^9 *E. coli* + DTNB (10 mg/Kg; s.c.; T12/T12; tratados de 12 em 12 horas após a *E. coli*); 3) 1×10^9 *E. coli* + DTNB (25 mg/Kg; s.c.; T0; tratados 30 min antes da *E. coli*); 4) DTNB (25 mg/Kg; T0 h) e 5) PBS (150 μ l; s.c.; grupo controle; T0 h). A sobrevivência dos animais foi acompanhada diariamente por cinco dias consecutivos, a partir do início dos tratamentos. A quantidade de bactéria administrada nos animais foi escolhida com base em trabalhos prévios (Waymack et al., 1990).

3.3.17. Efeito de compostos sobre a resposta induzida por L-cisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP e pré-contráídos com fenilefrina

Para examinar prováveis mecanismos envolvidos no vasorelaxamento mediado pela L-cisteína associado a pré-incubação dos vasos com o SNAP, foram analisados experimentos com os compostos: ODQ (10 μ M; inibidor da guanilato ciclase solúvel); KT 5823 e KT 5720 (1 μ M; inibidor da PKG e PKA, respectivamente); TEA (tetraetilamônio; 10 mM; bloqueador não-seletivo de canais de K^+); 4-aminopiridina (1mM; bloqueador de K_v); glibenclamida (10 μ M;

bloqueador de K_{ATP}); clotrimazol (10 μ M; bloqueador de IK_{Ca} e inibidor de citocromo P-450) e caribdotoxina (100 nM; bloqueador de BK_{Ca}), os quais foram incubados por 15 min antes da confecção das curvas. Baseado em protocolos anteriores, foram construídas CCR I e CCR II para fenilefrina, e 30 min após procedia-se a incubação com SNAP (200 μ M). Já as CCR III para L-cisteína (1, 10 e 100 μ M; 10 min) foi executada na presença dos compostos acima em anéis pré-contraídos com fenilefrina (1 nM a 100 μ M; 0,5 a 1 g de tensão), 60 min após a pré-incubação com SNAP. Os experimentos com ODQ e SNAP foram realizados em vasos com e sem endotélio, e os demais somente em vasos com endotélio. Já os experimentos controles foram devidamente conduzidos na presença e ausência destes compostos isoladamente, ou ainda somente com PBS.

3.4. DROGAS

Neste estudo, utilizaram-se as seguintes drogas e fontes comerciais: EGTA (etilenoglicol-bis(β -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraácido acético), indometacina, hidrocloreto de L-fenilefrina, cloreto de acetilcolina, SOD (superóxido dismutase, de origem bovina), captopril ([25]-1-[3-mercaptopropionil]-L-proline), clotrimazol {1-[(2-clorofenil)-difenil-metil]-1H-imidazol}, DTNB [ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico); ácido ditionitrobenzóico; 5,5'-ditiobis(nitrobenzoato); reagente de Ellman], diamida [ácido diazina-dicarboxílico bis (N, N dimetilamida)], L-cisteína, DTT (ditiotreitól), NS1619 {1,3-dihidro-1-[2-hidroxi-5-(trifluorometil)fenil]-5-5-[trifluorometil]-2H-benzimidazol-2}, glibenclamida, cloridrato de tetraetilamônio, 1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a-quinoxalin-1 (ODQ), 4-aminopiridina, L-NAME (N^{ω} -nitro-L-arginina metil ester), LPS [lipopolissacarídeo de *E. coli* (sorotipo 0111:B4 para experimentos *in vitro* e 0111:B6 para experimentos *ex vivo*)] (Sigma Chemical Co., USA); MnTBAP ([Mn(III) tetrakis (ácido benzóico) cloreto porfirina]), MK 886 ({3-1[1-*p*-clorobenzil]-5(isopropil)-3-*t*-butiltioindol-2-il]-2,2-dimetilpropanoico ácido, sódio}), 8-Bromo-GMPc (guanosina 3', 5'-cíclico monofosfato) (Calbiochem-Novabiochem Co., USA); cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) (Merck, Brasil);

fosfato dissódico de dexametasona (Prodome Química e Farmacêutica Ltda., Brasil); fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) (Nuclear - Casa da Química Indústria e Comércio Ltda., Brasil); caribdotoxina (Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel); trinitrato de glicerila (GTN) (doado pela Cristália Produtos Farmacêuticos, Brasil); sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), dextrose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (Reagen - Quimibrás, Brasil); heparina sódica (doado pela Cristália Produtos Farmacêuticos, Brasil); quetamina (DopalenTM; Agribands do Brasil Ltda., Brasil) e xilazina (RompumTM; Bayer S.A., Brasil) foram cedidas pela Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC.

A endotelina (ET-1) e o BQ123 foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Giles A. Rae do Departamento de Farmacologia da UFSC. As alíquotas de *E. coli* foram fornecidas pelo Laboratório Clínico Santa Luzia.

O S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP) foi sintetizado no próprio laboratório utilizando o método de descrito por Field e colaboradores (1978).

As soluções estoque de indometacina, glibenclamida e caribdotoxina foram dissolvidas em carbonato de cálcio (Na_2CO_3 ; 5 %), dimetil sulfóxido (DMSO) e albumina bovina (0,1 %), respectivamente. As demais drogas e as alíquotas de *E. coli* (4×10^9) foram diluídas em PBS. Todas as soluções estoques de drogas utilizadas no presente estudo foram armazenadas a - 20° C, exceto a caribdotoxina que foi acondicionada a - 70° C.

Os sais que compõem o líquido nutritivo de Krebs-Henseleit modificado, as soluções estoque das drogas utilizadas nestes estudo e o PBS foram preparados em água purificada em sistema de Milli Q (Millipore, Brasil).

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos através da média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de 5 a 10 experimentos, exceto para o ensaio de sobrevivência em camundongos (n= 10 a 20). Os dados foram apresentados como grama de tensão, porcentagem e área sob a curva. O efeito de contração, medido através da CCR para fenilefrina, foi expresso em gramas de tensão e em porcentagem e, o vasorelaxamento foi apresentado como porcentagem de redução do tônus previamente induzido pela fenilefrina (0,5 a 1 g como 100 %

da resposta). Os valores das áreas sob as curvas representados em unidades arbitárias foram calculados a partir dos dados em grama de tensão e em porcentagem e, apresentados quando apropriado.

A análise estatística dos resultados foi realizada através do teste de análise de variância (ANOVA) de uma e duas vias (para testes paramétricos), complementado pelo teste *t* modificado por Bonferroni, de acordo com o tipo de experimento. As diferenças estatísticas também foram analisadas com o teste *a priori* ou teste *t* de Student para amostras pareadas e não-pareadas. Já as diferenças entre os resultados de sobrevida, foram analisadas pelo teste Logrank (teste do qui-quadrado). Os cálculos foram efetuados através do Programa GraphPad Prism versão 3.02 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Influência da camada endotelial sobre a hiporeatividade à fenilefrina de longa duração induzida pelo SNAP

Segundo Terluk e colaboradores (2000), a exposição de anéis de aorta sem endotélio ao SNAP (70 e 200 μM ; 30 min) produziu hiporeatividade à fenilefrina. Neste estudo, a hiporeatividade à fenilefrina induzida pelo SNAP (200 μM) permaneceu acentuada até 2 horas e 10 min (tempo máximo avaliado) após o doador de NO, caracterizando um efeito de longa duração.

Os resultados do presente estudo demonstram que o SNAP causou hiporeatividade à fenilefrina, de maneira concentração-dependente, causando significativa redução da $R_{\text{máx}}$ α -adrenérgica das CCR II e das áreas sob as curvas (CCR II; Figura 1). Em vasos com endotélio, os valores das $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina (CCR II) foram reduzidos significativamente, quando comparados ao controle (100 % de contração; CCR I) para $57,2 \pm 5,17$ % e $31,4 \pm 6,9$ % após 20 e 200 μM de SNAP, respectivamente. Por outro lado, a concentração de 2 μM de SNAP não modificou significativamente a CCR II para fenilefrina ($R_{\text{máx}}$: $88,3 \pm 13,3$ %), quando comparado ao 100 % da resposta contrátil do grupo controle (Figura 1A).

De forma semelhante, em vasos sem endotélio, as $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina (CCR II) foram diminuídas significativamente (quando comparado ao controle 100 % de contração; CCR I) para os seguintes valores: $60,0 \pm 4,1$ % para 2 μM , $24,9 \pm 5,4$ % para 20 μM e $10,0 \pm 1,4$ % para 200 μM de SNAP (Figura 1B).

Como um outro parâmetro de análise a estes dados apresentados, a Figura 1C expressa os valores das áreas sob as curvas. Em vasos com endotélio, a área sob a curva para fenilefrina controle (CCR I; $254,7 \pm 4,1$) também foi reduzida após o SNAP para os seguintes valores: $154,9 \pm 19,2$ para 20 μM e $80,7 \pm 18,8$ para 200 μM (CCR II). Já a concentração de 2 μM não causou redução significativa da área sob a curva ($238,8 \pm 23,7$; CCR II), quando confrontado com o grupo controle. Em vasos sem endotélio, as concentrações de 2, 20 e 200 μM de SNAP diminuíram consideravelmente as áreas sob as curvas para fenilefrina controle (CCR I; $387,9 \pm 13,4$) para os

seguintes valores: $166,1 \pm 9,8$, $78,8 \pm 21,5$ e $27,7 \pm 3,4$, respectivamente (CCR II).

Em vasos com e sem endotélio, a comparação das $R_{\text{máx}}$ e as áreas sob as curvas para fenilefrina controle (CCR I) com o grupo que recebeu PBS (CCR II) não estabeleceu diferença estatística, demonstrando que as respostas contráteis para o agonista em questão, não se alteram no decurso temporal dos ensaios (Figura 1C e Tabela 1).

Já a comparação dos valores das áreas sob as curvas entre os vasos com endotélio *versus* os vasos sem endotélio revelou que existem diferenças expressivas entre todos os grupos comparados. Nesta análise, exceto para os grupos controle e o PBS, observa-se que todos os valores das áreas sob as curvas são significativamente menores nos vasos sem endotélio quando comparado aos vasos com endotélio (Figura 1C). Em síntese, este conjunto de resultados também mostra que a inibição do tônus vascular pelo SNAP é mais expressivo em vasos sem endotélio.

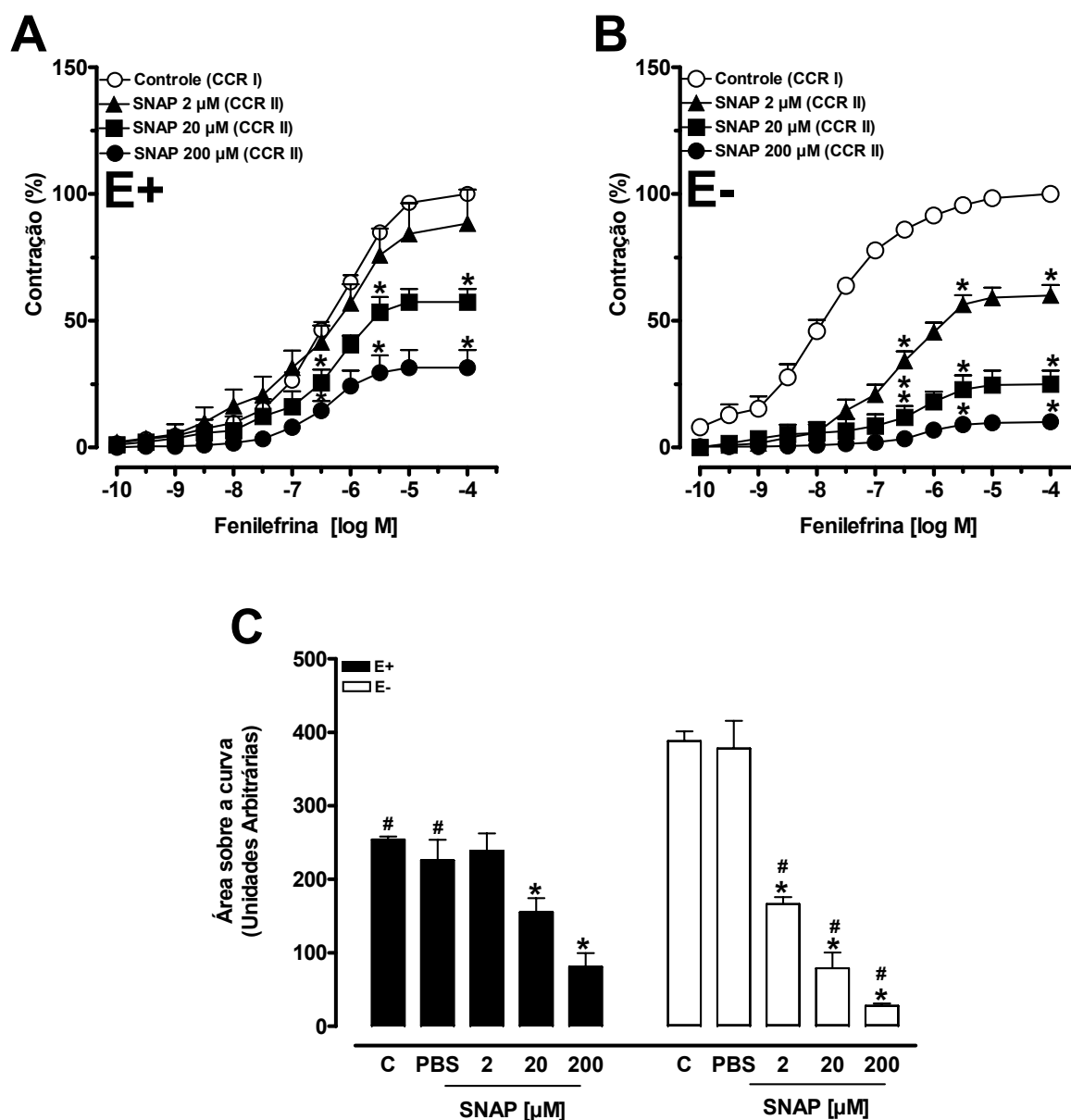


Figura 1 - Efeito do SNAP sobre as contrações induzidas pela fenilefrina em anéis de aorta com e sem endotélio. A Figura 1A (E+; grupo com endotélio) e a Figura 1B (E-; grupo sem endotélio) demonstram as curvas concentração-resposta para fenilefrina (0,1 a 100 μ M) antes (CCR I) e após a exposição dos vasos ao SNAP (2, 20 e 200 μ M; CCR II). A Figura 1C mostra as áreas sob as curvas para fenilefrina. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos, e as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni (Figura 1A, 1B e 1C; símbolo *) e, teste t de Student não-pareado (Figura 1C; ; os valores menores foram representado pelo símbolo #) para o grupo E+ versus grupo E-.

4.2. Análise da participação de mediadores derivados do endotélio na redução da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP

Como mostram as Figuras 2 e 3, a incubação com SOD (100 UI/ml), MnTBAP (100 μ M), MK 886 (10 μ M), BQ123 (1 μ M), clotrimazol (10 μ M) e captopril (10 μ M) não alteram a hiporeatividade à fenilefrina obtida com SNAP (200 μ M) em vasos com endotélio. Com relação a influência destes compostos sobre a contração mediada pela fenilefrina, a Tabela 1 mostra que a incubação com SOD, MnTBAP, MK 886 e BQ123 não causou mudança significativa da CCR II ($R_{\text{máx}}$), em comparação a CCR I controle. De forma semelhante, a indometacina não interferiu com a $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina (resultados não mostrados). Por outro lado, o clotrimazol e o captopril potencializaram as $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina, em torno de 50 %, quando comparado ao controle (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito de compostos sobre a resposta contrátil para fenilefrina. As respostas máximas contráteis ($R_{\text{máx}}$) e as áreas sob as curvas (AC) foram obtidas das curvas concentração-resposta para fenilefrina (CCR I e CCR II) em anéis com (E+) e sem (E-) endotélio.

	AC	Valores de p	$R_{\text{máx}}$ (%)	Valores de p
CCR I				
E- Controle	387,9 \pm 13,4	ns	100,0 \pm 0	ns
E+ Controle	254,7 \pm 4,1	ns	100,0 \pm 0	ns
CCR II	AC	Valores de p	$R_{\text{máx}}$ (%)	Valores de p
E- PBS	377,9 \pm 37,5	ns	113,0 \pm 7,4	ns
E+ PBS	225,6 \pm 28,4	ns	94,8 \pm 5,7	ns
E+ SOD (100 UI/ml)	203,6 \pm 38,7	ns	79,8 \pm 10,0	ns
E+ MnTBAP (100 μ M)	249,7 \pm 33,4	ns	100,0 \pm 0	ns
E+ MK 886 (10 μ M)	251,1 \pm 49,3	ns	109,1 \pm 14,5	ns
E+ BQ123 (1 μ M)	245,0 \pm 70,2	ns	113,5 \pm 5,5	ns
E+ Clotrimazol (10 μ M)	363,9 \pm 72,6*	ns	148,8 \pm 19,4	*
E+ Captopril (10 μ M)	366,9 \pm 19,8*	ns	155,4 \pm 6,5	*

Os resultados representam a média \pm e.p.m. de 5 a 10 experimentos individuais por grupo. As diferenças estatísticas entre os grupos controles *versus* os grupos tratados com os diferentes compostos (E+) ou PBS (E+ ou E-) foram determinadas através do teste *t* de Student não-pareado e, teste de ANOVA de duas vias, seguido de teste de Bonferroni, respectivamente, e foram representados pelos símbolos * ($P < 0,05$). A indicação "ns" corresponde a dados estatisticamente não significantes ($P > 0,05$).

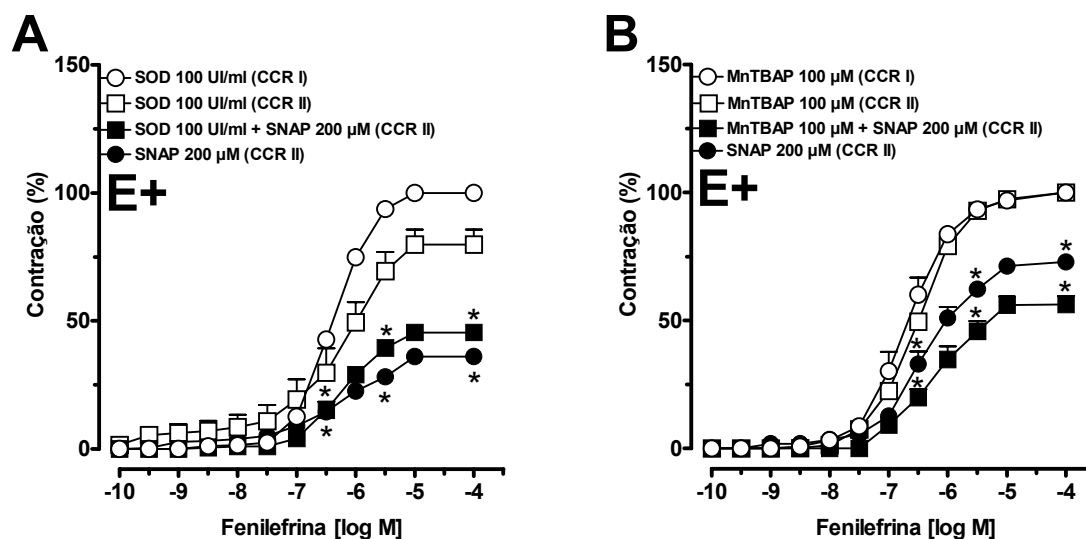


Figura 2 - Efeito da SOD e MnTBAP sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta com endotélio. A Figura 2A e 2B demonstram as curvas concentração-resposta para fenilefrina (CCR I e CCR II) após a exposição dos vasos a SOD, MnTBAP e SNAP. A indicação gráfica E+ corresponde à presença de endotélio. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m., * $P < 0,05$, estatisticamente diferente (CCR I *versus* CCR II), ANOVA de duas vias seguido de teste *t* de Bonferroni.

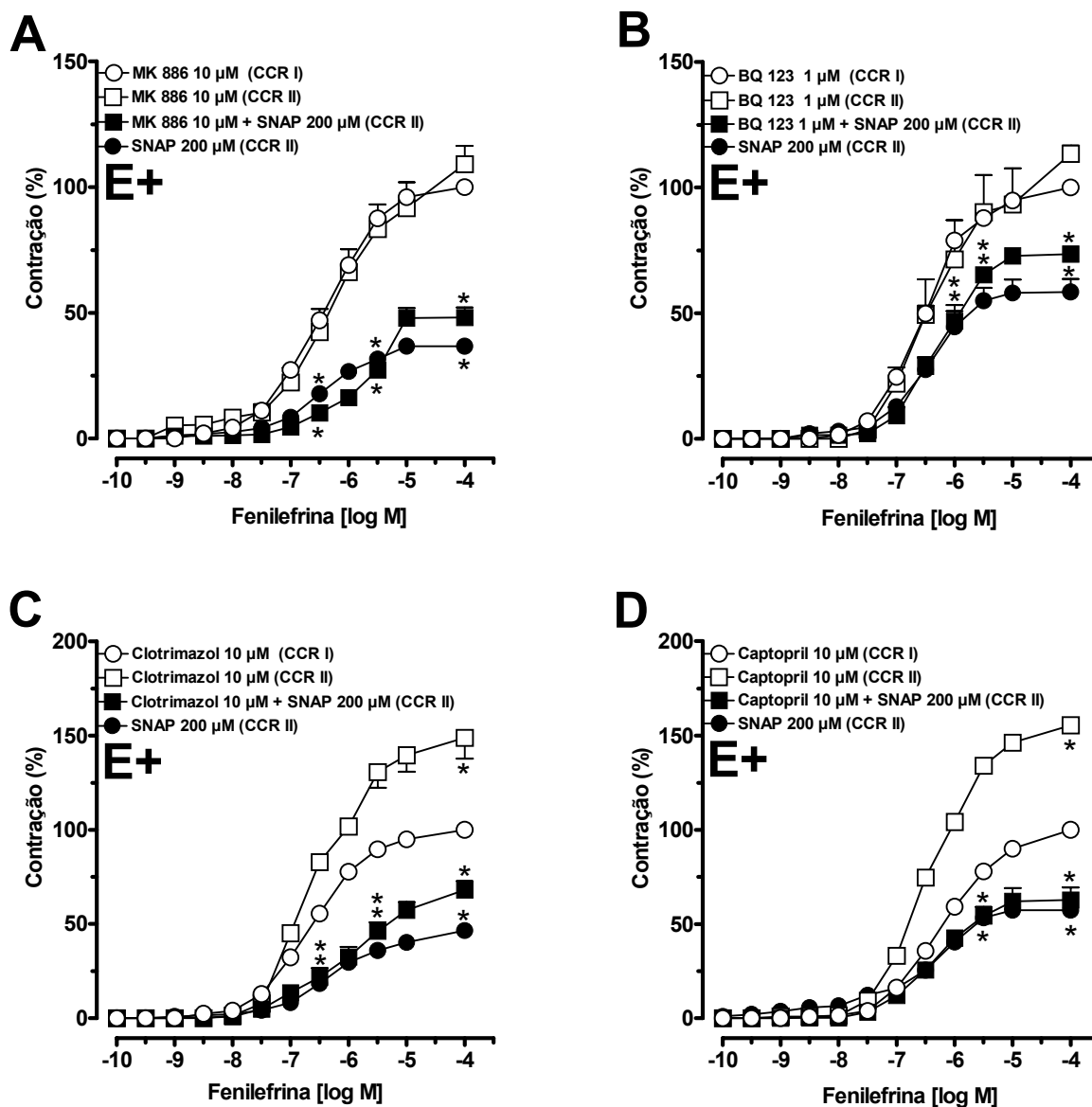


Figura 3 - Efeito de compostos sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta com endotélio. A Figura 3A, 3B, 3C e 3D mostram as curvas concentração-resposta para fenilefrina (CCR I e CCR II) após a exposição dos vasos ao MK 886, BQ123, clotrimazol, captopril e SNAP. A indicação gráfica E+ corresponde à presença de endotélio. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. * $P < 0,05$, estatisticamente diferente (CCR I *versus* CCR II), ANOVA de duas vias seguido de teste *t* de Bonferroni.

4.3. Efeito da pré-incubação com SNAP sobre o vasorelaxamento mediado pela acetilcolina

A acetilcolina causou relaxamento em anéis com endotélio pré-contráídos com fenilefrina (10 μ M), de maneira concentração-dependente (CCR I e CCR II; Figura 4). Entretanto, o vasorelaxamento para acetilcolina não foi modificado, após a incubação durante 30 min dos vasos com o PBS ou o SNAP (200 μ M; CCR II), quando comparado ao controle, ou seja, o relaxamento obtido no início dos experimentos (CCR I).

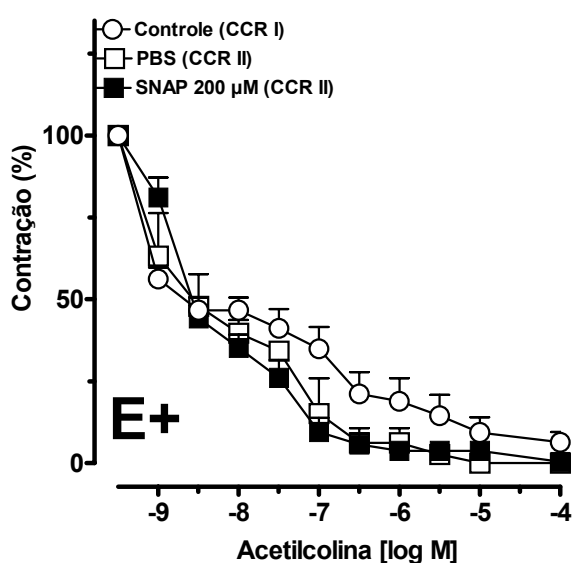


Figura 4 - Efeito da pré-incubação com SNAP sobre o relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta com endotélio. Curvas concentração-resposta para acetilcolina, antes (CCR I) e após o SNAP ou PBS (CCR II) em vasos pré-contráídos com fenilefrina. A indicação gráfica E+ corresponde à presença de endotélio. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. $P > 0,05$, estatisticamente sem diferença (CCR I *versus* CCR II), ANOVA de duas vias seguido de teste *t* de Bonferroni.

4.4. Análise do efeito do DTNB sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP e GTN

4.4.1. Efeito da pré-exposição de anéis de aorta com e sem endotélio ao DTNB sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina produzida pelo SNAP

Para este conjunto de resultados, a hiporeatividade vascular à fenilefrina induzida pelo SNAP também foi obtida 60 min após a exposição dos vasos ao doador de NO, conforme demonstrado anteriormente (Figura 1). Os valores das $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina após o SNAP (200 μM) foram de $0,54 \pm 0,06$ g (Figura 5A e 5C; CCR II) e $0,26 \pm 0,07$ g (Figura 5B e 5D; CCR II) para vasos com e sem endotélio, respectivamente. Estatisticamente, estes valores apresentaram diferenças significantes quando comparado as $R_{\text{máx}}$ controles obtidas antes (CCR I) e após a exposição dos vasos ao DTNB (CCR II; 10 e 100 μM ; Figura 5). A Figura 5 também demonstra que a pré-incubação com o DTNB preveniu a instalação da hiporeatividade à fenilefrina produzida pelo SNAP (200 μM) em preparações com e sem endotélio. As $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina após o DTNB e o SNAP (CCR III) foram de $0,89 \pm 0,15$ g (DTNB 10 μM) e $1,04 \pm 0,07$ g (DTNB 100 μM) em vasos com endotélio e, $1,06 \pm 0,19$ g (DTNB 10 μM) e $0,84 \pm 0,13$ g (DTNB 100 μM) em vasos sem endotélio. Estes valores foram equivalentes aos respectivos controles obtidos após a exposição dos vasos ao DTNB (CCR II; Figura 5) e não houveram diferenças estatísticas.

O perfil temporal das resposta contráteis para fenilefrina na presença e na ausência do efeito do DTNB estão apresentados na Tabela 2. Em vasos com e sem endotélio, o tratamento com DTNB (10 e 100 μM) não afetou as $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina da CCR II e CCR III, quando comparado a CCR I controle. De forma similar, a $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina obtida após a incubação com PBS (CCR II e CCR III) não diferiu da $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina da curva controle (CCR I), exceto a CCR III em preparações com endotélio (Tabela 2).

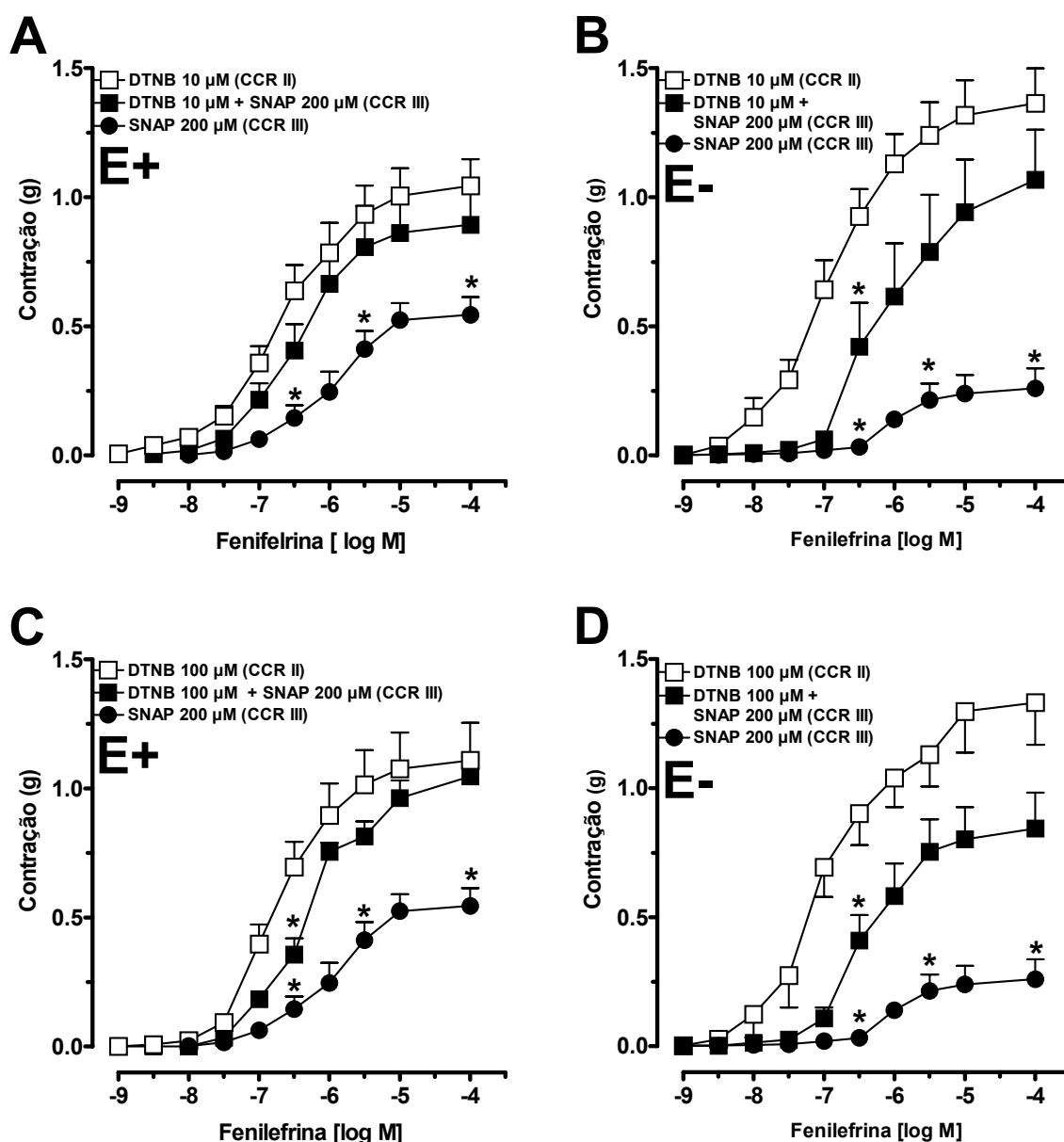


Figura 5 - Efeito do DTNB na prevenção da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta com e sem endotélio. Curvas concentração-resposta para fenilefrina após a exposição dos vasos ao DTNB e SNAP (CCR II e CCR III). A indicação gráfica E+ e E- corresponde à presença ou a ausência de endotélio, respectivamente. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. * $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de duas vias seguido de teste t de Bonferroni.

Tabela 2 - Efeito do DTNB sobre a resposta contrátil para fenilefrina. As respostas máximas contráteis (R_{máx}) e a áreas sob as curvas (AC) foram obtidas das curvas concentração-resposta para fenilefrina (CCR I e CCR II) em anéis com (E+) e sem (E-) endotélio.

	AC	Valores de p	R _{máx} (g)	Valores de p
CCR I				
E+ Controle	2,19 ± 0,10	ns	0,84 ± 0,03	ns
E- Controle	3,23 ± 0,31	ns	1,09 ± 0,11	ns
	AC	Valores de p	R _{máx} (g)	Valores de p
CCR II				
E+ PBS	2,83 ± 0,20	ns	1,07 ± 0,07	ns
E+ PBS + DTNB 10 µM	2,76 ± 0,31	ns	0,99 ± 0,12	ns
E+ PBS + DTNB 100 µM	2,91 ± 0,32	ns	1,11 ± 0,21	ns
E- PBS	3,99 ± 0,46	ns	1,38 ± 0,15	ns
E- PBS + DTNB 10 µM	4,19 ± 0,38	ns	1,02 ± 0,13	ns
E- PBS + DTNB 100 µM	4,00 ± 0,47	ns	1,22 ± 0,16	ns
	AC	Valores de p	R _{máx} (g)	Valores de p
CCR III				
E+ PBS	3,24 ± 0,39	*	1,25 ± 0,14	*
E+ PBS + DTNB 10 µM	2,95 ± 0,26	ns	1,04 ± 0,10	ns
E+ PBS + DTNB 100 µM	3,44 ± 0,54	*	1,10 ± 0,14	ns
E- PBS	3,60 ± 0,40	ns	1,35 ± 0,09	ns
E- PBS + DTNB 10 µM	3,38 ± 0,77	ns	1,36 ± 0,13	ns
E- PBS + DTNB 100 µM	3,28 ± 0,84	ns	1,33 ± 0,16	ns

Os resultados representam a média ± e.p.m. de 5 a 10 experimentos individuais por grupo. As diferenças estatísticas entre os grupos controles (E+ ou E-) e os grupos tratados com DTNB ou PBS foram determinadas através do teste de ANOVA de duas vias seguido pelo teste *t* de Bonferroni e, foram representadas pelo símbolo * para $P < 0,05$. A indicação “ns” corresponde a dados estatisticamente não significantes ($P > 0,05$).

4.4.2. Efeito da exposição de anéis de aorta com endotélio ao DTNB após a indução da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina produzida pelo SNAP e GTN

Os resultados também demonstram que a incubação do DTNB (100 µM) após o SNAP, foi capaz de reverter a hiporeatividade à fenilefrina promovida pelo SNAP (Figura 6A). O SNAP diminuiu significativamente a R_{máx} para fenilefrina (CCR II) para $0,56 \pm 0,07$ g (*versus* CCR I controle; $1,30 \pm 0,1$ g). Nestes experimentos, após a hiporeatividade à fenilefrina, a incubação dos vasos com o DTNB (100 µM) causou aumento das R_{máx} para $1,56 \pm 0,20$ g

(CCR III) e, a comparação deste valor com o controle acima citado não revelaram diferenças estatísticas. Resultados semelhantes foram observados para o grupo de vasos que receberam o co-tratamento de DTNB (100 μ M) e DTT (200 μ M) após a hiporeatividade produzida pelo SNAP (CCR III; $1,40 \pm 0,26$ g). Como mostrado na Figura 6B, o DTNB (100 μ M) e o DTT (200 μ M) não interferiram na resposta contrátil para fenilefrina no decurso dos experimentos (CCR III). Além disso, o valor da $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina do grupo DTT (100 μ M) não diferiu do grupo controle (Figura 9B).

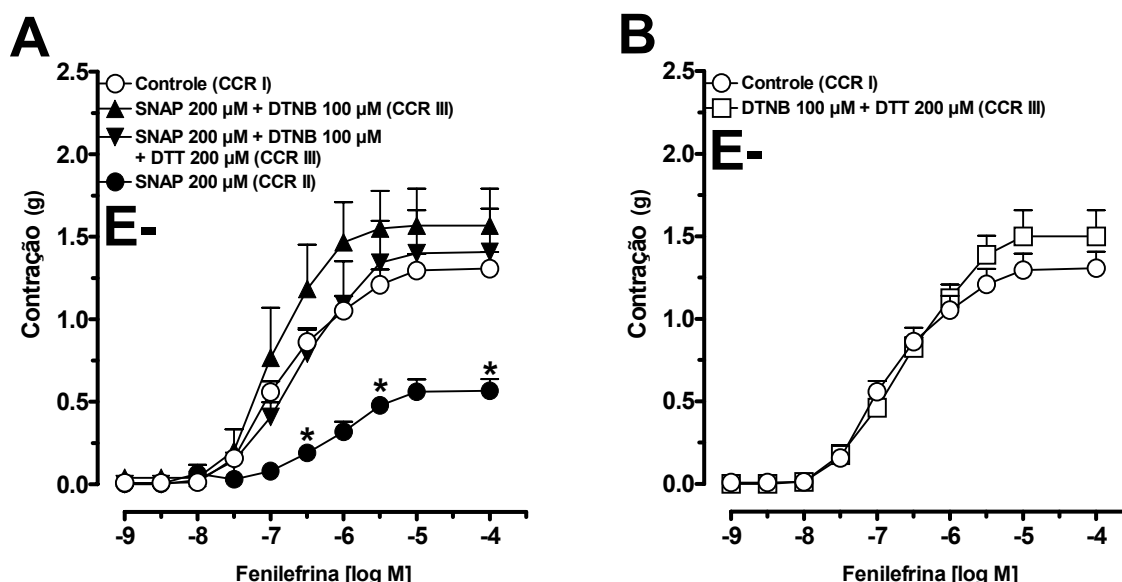


Figura 6 - Efeito do DTNB na reversão da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta sem endotélio. Curvas concentração-resposta para fenilefrina antes (CCR I) e após a exposição dos vasos ao SNAP, DTNB e/ou DTT (CCR II e CCR III). A indicação gráfica E- corresponde a ausência de endotélio. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. * $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de duas vias seguido de teste t de Bonferroni (Figura 6A) e, teste t de Student pareado (Figura 6B).

Outro doador de NO, o GTN (200 μ M) também foi efetivo em promover a hiporeatividade à fenilefrina em vasos com endotélio (Figura 7A). Os valores médios das $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina controle (CCR I) e após o GTN foram de $1,30 \pm 0,16$ e $0,92 \pm 0,10$ g, respectivamente, e portanto, apresentaram

significância estatística. Entretanto, a aplicação do teste *t* (não-pareado) revelou uma diferença estatística entre as R_{\max} para fenilefrina do grupo SNAP e o grupo GTN (Figura 5A ou 5C *versus* Figura 7A), demonstrando que a hiporeatividade foi maior em vasos com endotélio que receberam o SNAP. É importante ressaltar que as mesmas condições experimentais foram mantidas para os vasos tratados com SNAP ou GTN, incluindo a concentração utilizada e o tempo de incubação. Conforme dados apresentados anteriormente, as respostas contráteis para fenilefrina controle e, ao longo do tempo experimental não foram modificadas (Figura 7B).

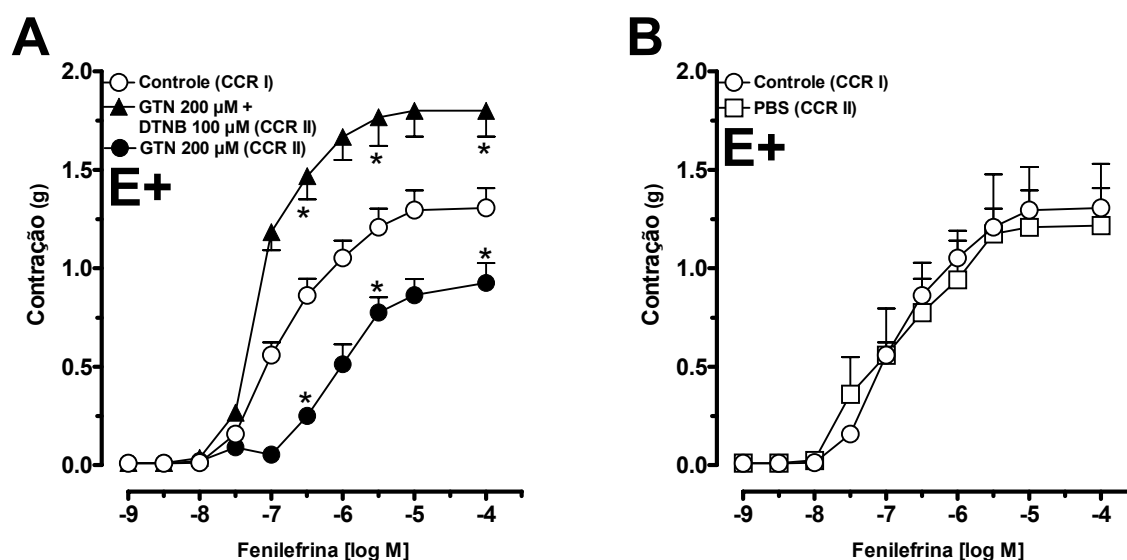


Figura 7 - Efeito do DTNB na reversão da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo GTN em anéis de aorta com endotélio. Curvas concentração-resposta para fenilefrina antes (CCR) e após a exposição dos vasos ao GTN e DTNB (CCR II). A indicação gráfica E+ corresponde à presença de endotélio. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. * $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de duas vias seguido de teste *t* de Bonferroni (Figura 7A) e, teste *t* de Student não-pareado (Figura 7B).

4.5. Análise do efeito da diamida sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP

4.5.1. Efeito da pré-exposição de anéis de aorta com endotélio a diamida sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina produzida pelo SNAP

Neste conjunto de experimentos, constatou-se que a prévia exposição dos vasos a um outro agente oxidante, a diamida, na concentração de 200 μM , preveniu efetivamente a hiporeatividade à fenilefrina mediada pelo SNAP (200 μM) (Figura 8). Os valores das $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina controle antes (CCR I: $1,30 \pm 0,16$ g) e após a diamida (200 μM ; CCR II: $1,39 \pm 0,13$ g) foram semelhantes a $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina, após a exposição dos vasos a diamida (200 μM) e ao SNAP (200 μM) (CCR III; $1,05 \pm 0,13$ g). Entretanto, a concentração de 100 μM de diamida não inibiu a hiporeatividade induzida pelo SNAP (200 μM ; Figura 8A). Com relação ao perfil temporal do efeito da diamida sobre as resposta contráteis para fenilefrina, as $R_{\text{máx}}$ antes (CCR I; $1,30 \pm 0,16$ g) e após 100 μM (CCR II: $1,20 \pm 0,12$ g; CCR III: $1,13 \pm 0,10$ g) e 200 μM (CCR II: $1,39 \pm 0,13$ g; CCR III $1,18 \pm 0,22$ g) da diamida não demonstraram diferenças.

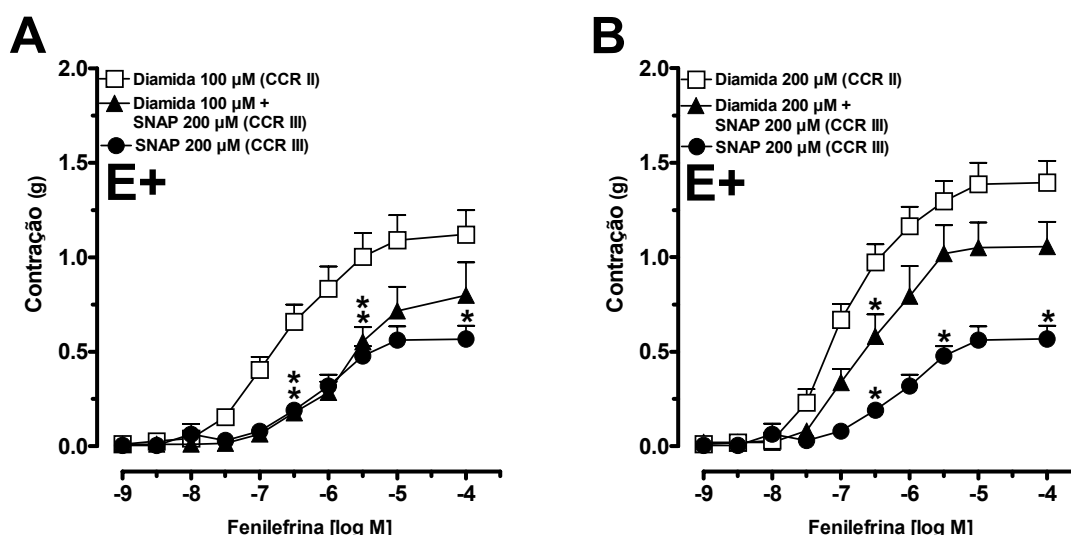


Figura 8 - Efeito da diamida na prevenção da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta com endotélio. Curvas concentração-resposta para fenilefrina após a exposição

dos vasos a diamida e ao SNAP (CCR II). A indicação gráfica E+ corresponde à presença de endotélio. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. * $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de duas vias seguido de teste t de Bonferroni.

4.6. Efeito da exposição de anéis de aorta sem endotélio ao DTT após a indução da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina produzida pelo SNAP

Em vasos sem endotélio, a concentração de 20 μM de SNAP reduziu significativamente a $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina (CCR II: $0,91 \pm 0,16$ g), quando comparado ao controle (CCR I: $1,55 \pm 0,05$ g), conforme demonstrado na Figura 9A. Entretanto, o DTT (100 μM) não reverteu a hiporeatividade à fenilefrina mediada pela SNAP (CCR II: $0,98 \pm 0,17$ g). Além disso, os valores das $R_{\text{máx}}$ para fenilefrina dos grupos DTT (CCR II: $1,33 \pm 0,20$ g) e PBS (CCR II: $1,49 \pm 0,15$ g) não diferiram do grupo controle (Figura 9B).

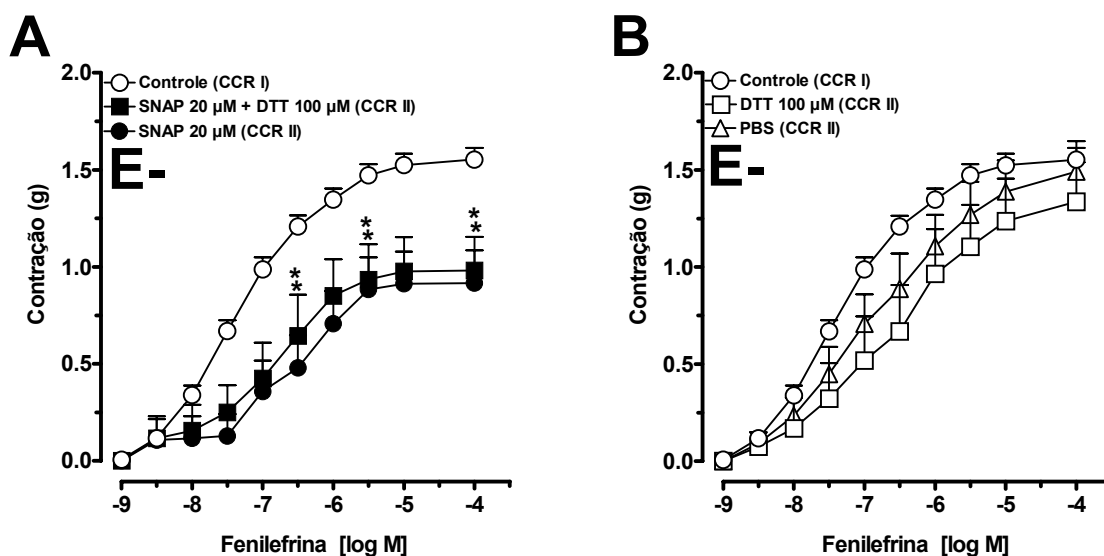


Figura 9 - Efeito do DTT sobre da hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo SNAP em anéis de aorta sem endotélio. Curvas concentração-resposta para fenilefrina antes (CCR I) e após a exposição dos vasos ao SNAP e DTT (CCR II). A indicação gráfica E- corresponde a ausência de endotélio. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. * $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de duas vias seguido de teste t de Bonferroni (Figura 9A e 9B).

4.7. Caracterização da resposta de vasorelaxamento de longa duração causada pela L-cisteína e N-acetilcisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP

Conforme citado na seção de Material e Métodos, o efeito da L-cisteína e N-acetilcisteína foram avaliados em vasos com e sem endotélio pré-contráídos com fenilefrina (0,5 a 1 g) e previamente expostos ao SNAP. Este desenho experimental buscou avaliar o efeito de relaxamento mediado pelos referidos tióis, analisando a possível mobilização de NO no tecido vascular decorrente da incubação com SNAP. Sessenta min após a incubação dos vasos com o SNAP (200 μ M), a adição de L-cisteína e N-acetilcisteína (1 a 300 μ M) produziram relaxamento, de maneira concentração-resposta, conforme apresentados na Figura 10A e 10B, respectivamente. O relaxamento máximo, em torno de 100 %, foi obtido com a concentração de 300 μ M de L-cisteína ou N-acetilcisteína após o SNAP (Figura 10A e 10B), na presença e na ausência de endotélio. A pré-exposição de vasos com e sem endotélio ao SNAP, resultou em um relaxamento semelhante para todas as concentrações de N-acetilcisteína, como pode ser observado na Figura 10 B. Por outro lado, a L-cisteína (30 e 100 μ M) causou um relaxamento maior em vasos sem endotélio pré-incubados com SNAP, quando comparado a vasos com endotélio. Esta diferença de vasorelaxamento em preparações com e sem endotélio expostas a L-cisteína também foi analisada através dos valores médios das áreas sob as curvas. É importante ressaltar que nesta análise o efeito de vasorelaxamento corresponde a uma redução dos valores médios das áreas sob as curvas, descritos a seguir. Assim, o SNAP reduziu a área sob a curva para L-cisteína (CCR III: $362,7 \pm 17,3$ e $283,5 \pm 16,5$) quando comparado ao controle (CCR III: $604,6 \pm 13,9$ e $609,2 \pm 13,9$) para vasos com e sem endotélio, respectivamente. Baseado nos dados anteriormente citados, a área sob a curva para L-cisteína em vasos com e sem endotélio expostos ao SNAP não revelou diferença estatística. Finalmente, as Figuras 10A e 10B também mostraram que os

grupos controle, com e sem endotélio, que receberam somente L-cisteína ou N-acetilcisteína não manifestaram relaxamento.

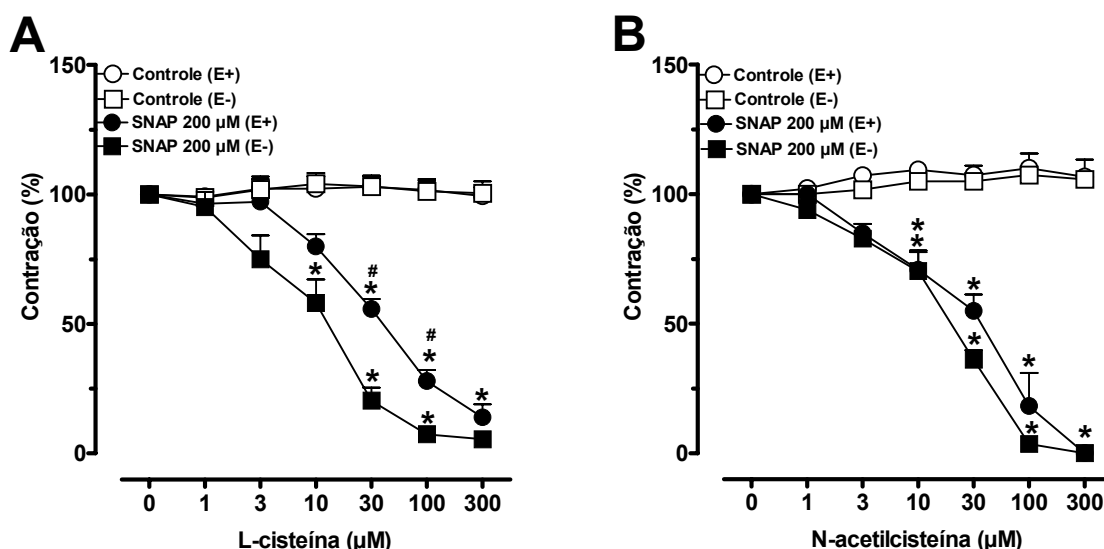


Figura 10 - Efeito da L-cisteína e N-acetilcisteína em anéis de aorta com e sem endotélio expostos ao SNAP. Curvas concentração-resposta para L-cisteína e N-acetilcisteína em vasos pré-contraídos com fenilefrina e expostos ao SNAP e PBS (controle). A indicação gráfica E+ e E- corresponde à presença ou a ausência de endotélio. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. * e # $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de uma via seguido de teste t de Bonferroni. O símbolo # representa a diferença estatística entre o grupo E+ *versus* grupo E-, tratados com SNAP.

4.8. Efeito do decurso temporal sobre o vasorelaxamento de longa duração causada pela L-cisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP

A Figura 11B, expressa os valores médios das áreas sob as curvas obtidas através das CCR para L-cisteína (1, 10 e 100 μM) de vasos com endotélio expostos ao SNAP (200 μM) e PBS (controle). Nos intervalos avaliados (60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 min) após o SNAP, as áreas sob as curvas foram reduzidas significativamente, quando comparado aos controles nos mesmos intervalos de tempo. Por outro lado, a comparação do relaxamento inicial do grupo SNAP (área sob a curva aos 60 min) com os demais intervalos (*versus* área sob a curva aos 90, 120, 150, 180, 210 e 240

min) não indicou diferença estatística, demonstrando que o mesmo perfil de vasorelaxamento foi mantido em todas as avaliações.

As várias exposições do grupo controle a L-cisteína causaram redução das áreas sob as curvas aos 150, 180 e 240 min após o PBS (todos os intervalos de tempo *versus* a área sob a curva aos 60 min). É importante ressaltar que, nesta série de experimentos, os resultados apresentados foram obtidos na presença constante do inibidor de NOS, o L-NAME (100 μ M).

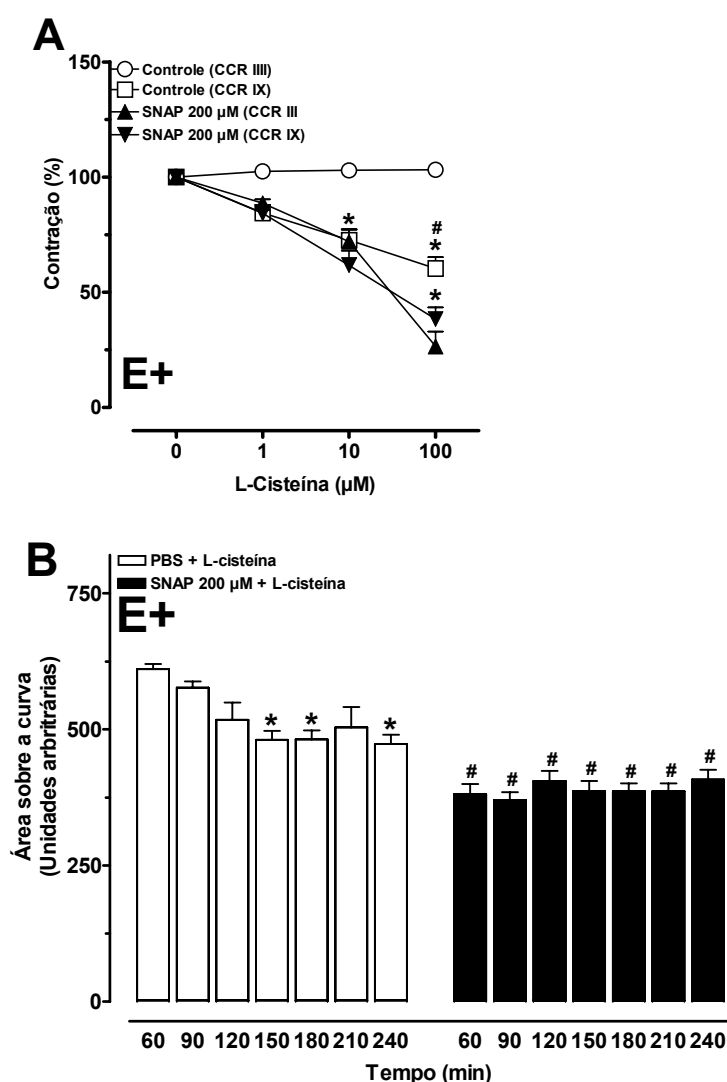


Figura 11 - Efeito do decurso temporal na resposta para L-cisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP. Curvas concentração-resposta para L-cisteína (1, 10 e 100 μ M; Figura 11A) e áreas sob as curvas (Figura 11B) em vasos pré-contraídos com fenilefrina e expostos ao SNAP e ao PBS (controle). A indicação gráfica E+ corresponde à presença de endotélio. Cada ponto

representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. * e # $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de uma via seguido de teste t de Bonferroni. O símbolo # representa a diferença estatística entre o grupo SNAP *versus* grupo PBS.

4.9. Efeito da L-cisteína sobre a hiporeatividade à fenilefrina em anéis de aorta expostos ao SNAP

Conforme detalhado em Material e Métodos (item 3.3.7), 30 min após as exposições das preparações ao SNAP (200 μM) ou PBS e, L-cisteína (60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 min), foram construídas curvas para fenilefrina (CCR X; 1 nM a 100 μM).

A Figura 12 mostra que várias exposições dos vasos à L-cisteína revertem a hiporeatividade vascular causado pelo SNAP. Assim, a CCR X para fenilefrina atinge valores próximos a curva controle (CCR I) e, portanto, antes da incubação com o SNAP.

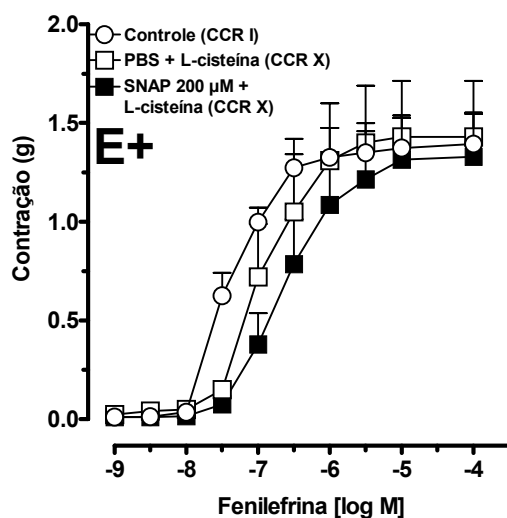


Figura 12 - Efeito da L-cisteína sobre a hiporeatividade à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio expostos ao SNAP. Curvas concentração-resposta para fenilefrina (0,1 a 100 μM) antes (CCR I) e após a exposição dos vasos ao SNAP, PBS e L-cisteína (CCR X). A indicação gráfica E+ corresponde à presença de endotélio. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. $P > 0,05$, estatisticamente sem diferença (CCR I *versus* CCR X), ANOVA de duas vias seguido de teste t de Bonferroni.

4.10. Efeito da pré-exposição ao DTNB sobre o relaxamento causado pela L-cisteína em anéis de aorta com e sem endotélio incubados com o SNAP e o GTN

A prévia exposição vascular à 100 μM de DTNB durante 15 min, impediu o relaxamento causado pela L-cisteína (1, 10 e 100 μM) em anéis com (Figura 13A) e sem (Figura 13B) endotélio, incubados com o SNAP (200 μM). Entretanto, a concentração de 100 μM de L-cisteína em preparações com endotélio atingiu uma inibição parcial do vasorelaxamento, sendo que estes achados foram confirmados através da diferença estatística entre o grupo que recebeu somente o SNAP e o grupo que recebeu o DTNB e o SNAP (identificado na Figura 13A pelo símbolo #).

Em outra série experimental, as preparações foram seqüencialmente expostas ao DTNB (100 μM), DTT (200 μM) e, posteriormente ao SNAP (200 μM), conforme descrito na seção de Material e Métodos. A incubação com DTT inibiu o efeito do DTNB, em prevenir o relaxamento mediado pela L-cisteína em preparações incubadas com o SNAP. Como pode ser observado na Figura 13C e 13D, o relaxamento promovido por L-cisteína foi obtido em vasos com e sem endotélio, respectivamente. Em experimentos controle, a L-cisteína não alterou a vasoconstrição obtida com fenilefrina em vasos com e sem endotélio incubados somente com DTNB (100 μM) e DTT (200 μM) (Figura 13C e 13D). Além disso, a L-cisteína não modificou significativamente a resposta contrátil para fenilefrina de vasos incubados somente com PBS (Figura 13A e 13C; vasos com endotélio e, Figura 13C e 13D; vasos sem endotélio).

Em outro grupo de ensaios, sob condições experimentais semelhantes a descrita anteriormente, foram obtidos os seguintes resultados: i) a L-cisteína (100 μM) também foi eficaz em induzir vasorelaxamento de vasos com endotélio pré-tratados com o GTN (200 μM); ii) a breve incubação dos vasos com o DTNB (100 μM) preveniu este vasorelaxamento mediado pela L-cisteína (Figura 14A) e iii) em experimentos controles (GTN e PBS) não foi evidenciado o vasorelaxamento (Figura 14B).

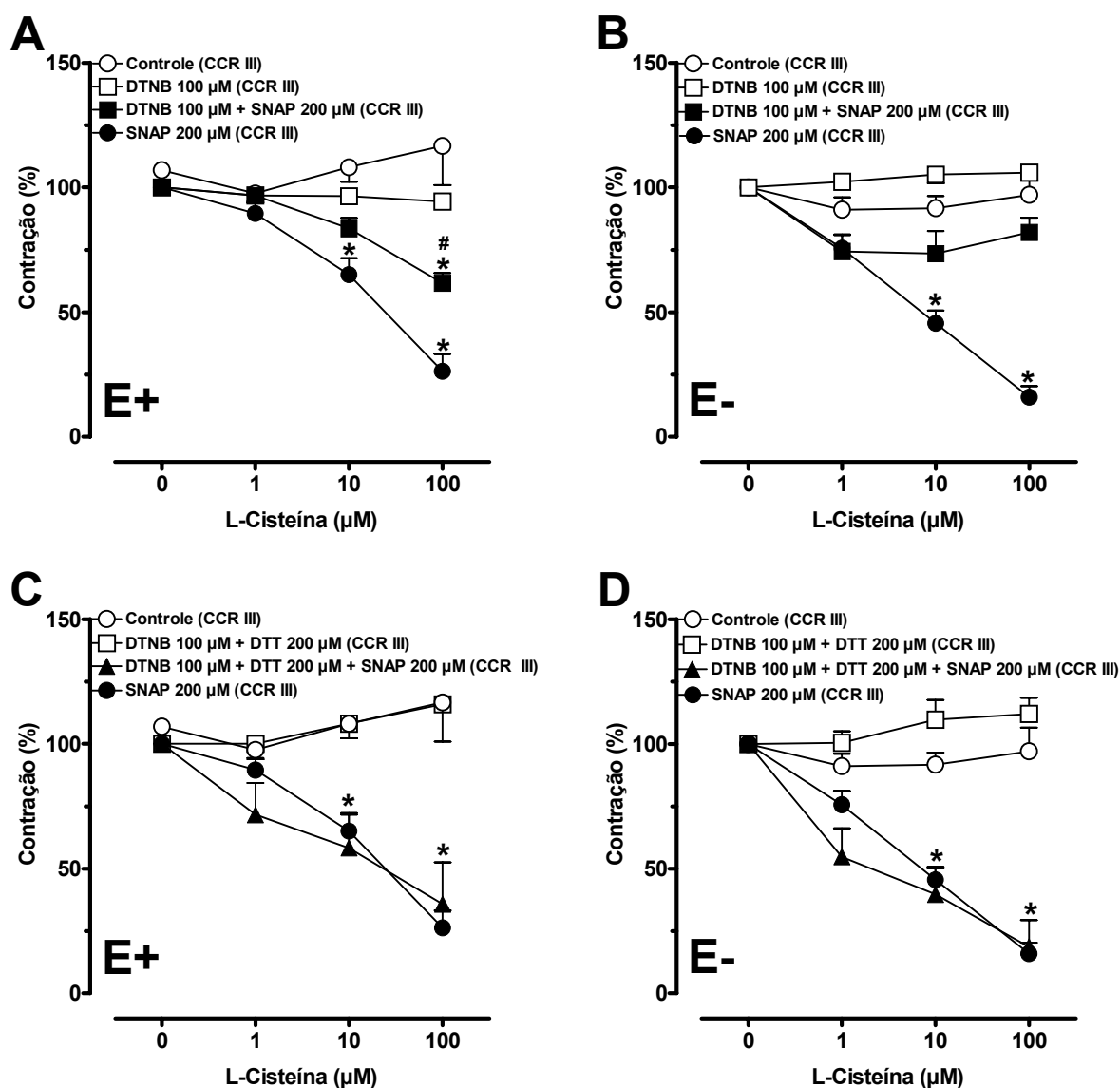


Figura 13 - Efeito da pré-exposição ao DTNB sobre relaxamento causado pela L-cisteína em anéis de aorta com e sem endotélio incubados com o SNAP. Curvas concentração-resposta (CCR) para L-cisteína em vasos pré-contráídos com fenilefrina e expostos ao DTNB, SNAP e PBS (controle). A indicação gráfica E+ e E- corresponde à presença ou a ausência de endotélio, respectivamente. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. * e # $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de uma via seguido de teste t de Bonferroni. O símbolo # representa a diferença estatística entre o grupo DTNB e SNAP *versus* grupo SNAP.

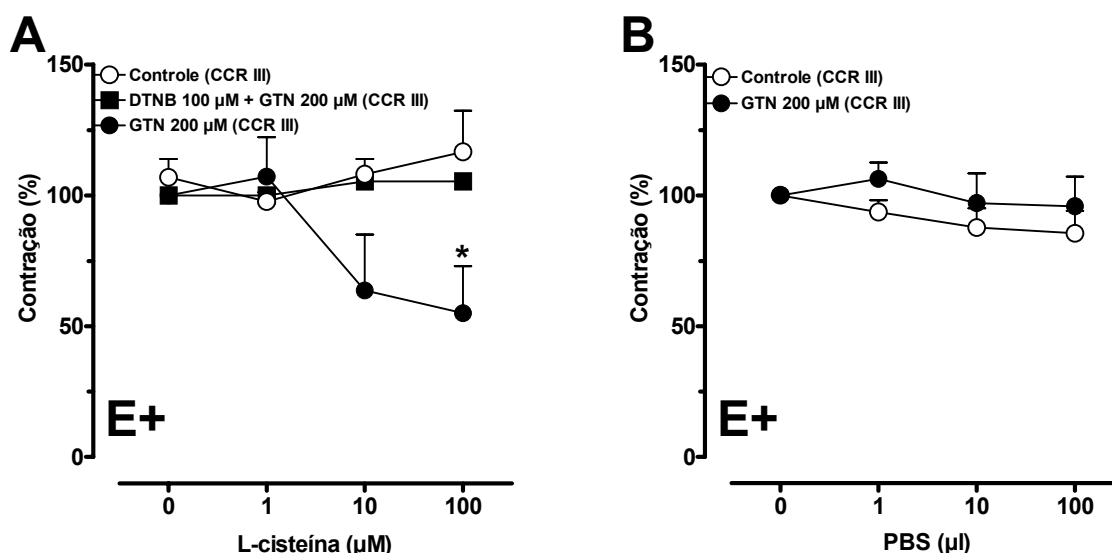


Figura 14 - Efeito da pré-exposição ao DTNB sobre relaxamento causado pela L-cisteína em anéis de aorta com endotélio incubados com o GTN. Curvas concentração-resposta (CCR) para L-cisteína em vasos pré-contraídos com fenilefrina e expostos ao DTNB, SNAP e PBS (controle). A indicação gráfica E+ corresponde à presença de endotélio. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. * $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de uma via seguido de teste t de Bonferroni (Figura 14 A) e, teste t de Student não-pareado (Figura 14B).

4.11. Efeito da pré-exposição ao DTNB sobre o relaxamento induzido por 8-Br-GMPc e NS1619 em anéis de aorta com endotélio incubados com SNAP e pré-contraídos com fenilefrina

O DTNB (100 μM) incubado durante 15 e 25 min não modificou o relaxamento obtido com o 8-Br-GMPc em vasos incubados com PBS, quando comparado as respostas controle, como apresentado na Figura 15A e 15B, respectivamente. Nestas mesmas condições experimentais, o DTNB (15 min) potencializou a relaxamento efetuado pelo 8-Br-GMPc (3, 10, 30 e 100 μM) em vasos pré-tratados com SNAP, conforme demonstrado na Figura 15A. As áreas sob as curvas dos vasos pré-tratados com o DTNB (15 min) e o SNAP ($361,7 \pm$

13,06) foi estatisticamente diferente do grupo controle ($464,8 \pm 13,6$), confirmando a análise anterior. Ademais, o grupo pré-tratado com o SNAP ($399,0 \pm 22,1$; Figura 13A) ou, somente com DTNB ($417,9 \pm 26,1$, 15 min e $502,1 \pm 2,25$, 25 min) induziram valores para as áreas sob as curvas para o 8-Br-GMPc, semelhante ao controle.

Os resultados ilustrados na Figura 15C foram obtidos a partir de vasos com endotélio, e mostram que a prévia incubação com $100 \mu\text{M}$ de DTNB durante 15 min, não modificou o relaxamento máximo para cada dose de NS1619 em preparações incubadas com DTNB ou SNAP ($200 \mu\text{M}$), quando comparado estatisticamente ao controle. E similarmente, a resposta relaxante produzida pelo NS1619 em vasos co-incubados com PBS e SNAP ($200 \mu\text{M}$) também não diferiram do controle (Figura 15C). Entretanto, a comparação com o grupo controle revelou que o relaxamento induzido pela concentração de $100 \mu\text{M}$ de NS1619 foi significativamente reduzida em preparações expostas ao DTNB ($100 \mu\text{M}$) durante 25 min. Por outro lado, ambos os grupos não demonstraram diferenças estatísticas para as concentrações de 1, 3, 10 e $30 \mu\text{M}$ de NS1619, conforme apresentado na Figura 15D).

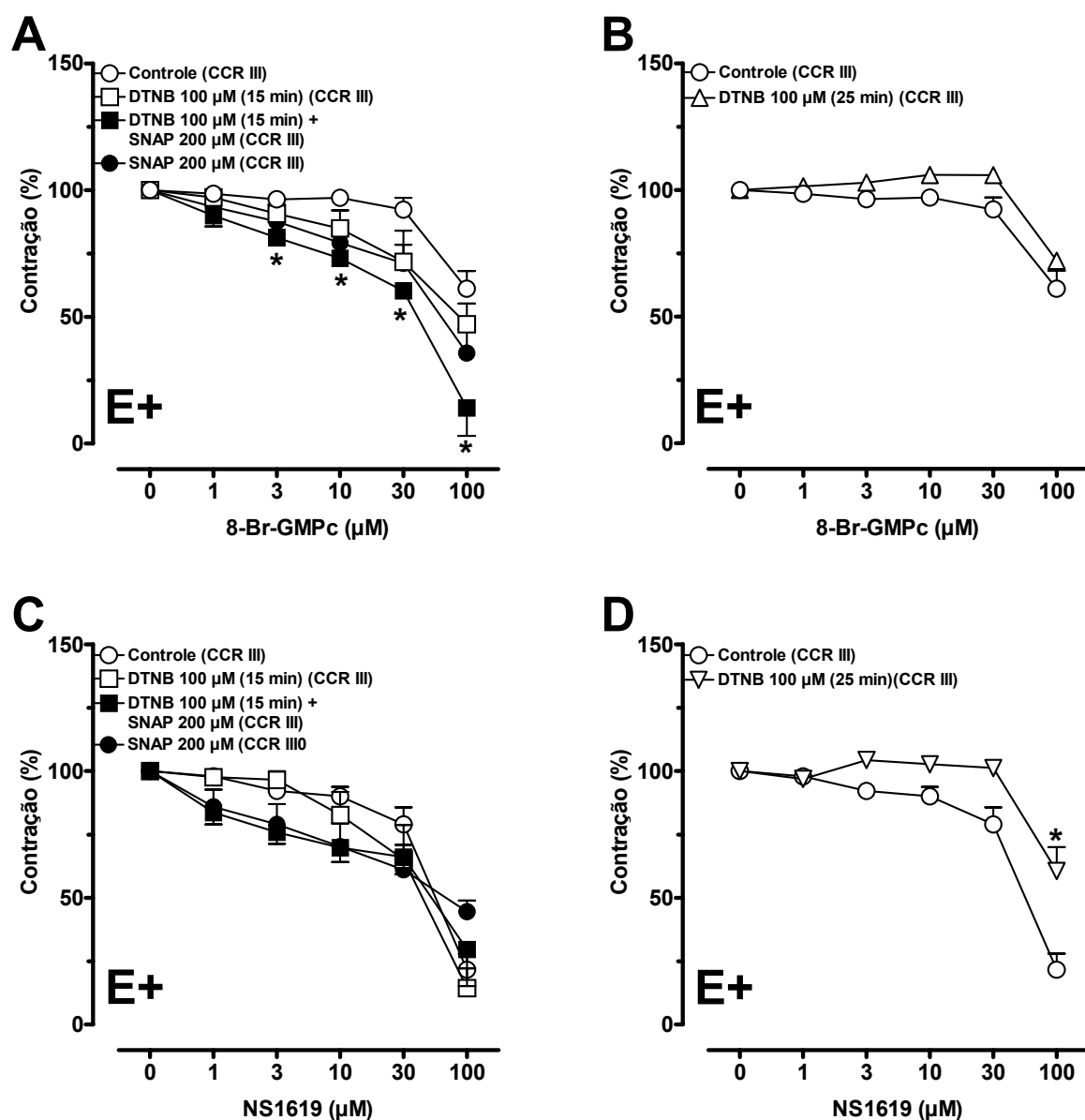


Figura 15 - Efeito da pré-exposição ao DTNB sobre o relaxamento induzido por 8-Br-GMPc e NS1619 em anéis de aorta com endotélio incubados com SNAP e pré-contraídos com fenilefrina. Curvas concentração-resposta (CCR) para 8-Br-GMPc e NS1619 em vasos pré-contraídos com fenilefrina e expostos ao DTNB, SNAP e PBS (controle). A indicação gráfica E+ corresponde à presença de endotélio. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. * $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de uma via seguido de teste t de Bonferroni (Figura 15 A e 15 C) e, teste t de Student não-pareado (Figura 15B e 15D).

4.12. Efeito do DTNB e do SNAP sobre as contrações induzidas por endotelina e a resposta promovida pela L-cisteína em anéis de aorta

Embora, este estudo não tenha incluído o uso de concentrações maiores de SNAP, os resultados do presente trabalho evidenciaram que 60 min após a incubação com o SNAP (200 μ M; $1,83 \pm 0,15$ g), a resposta contrátil para ET-1 (1 μ M) não foi modificada quando comparado a resposta controle ($1,67 \pm 0,18$ g; Figura 16A). Além disso, observa-se que os grupos: i) DTNB (100 μ M; $1,10 \pm 0,25$ g) e ii) DTNB (100 μ M) associado ao SNAP (200 μ M; $2,35 \pm 0,15$ g) não alteraram a resposta contrátil para ET-1, também quando comparado ao controle (Figura 16 A).

Como pode ser observado na Figura 16B, o vasorelaxamento mediado pela L-cisteína, em vasos pré-contráídos com ET-1 e tratados com o SNAP (200 μ M) foi inibido pela co-incubação com DTNB (100 μ M). Os resultados demonstram também que as concentrações de 30, 100 e 300 μ M de L-cisteína, foram efetivas em promover este vasorelaxamento no grupo SNAP. Já a inibição do vasorelaxamento através do DTNB, foi total para as concentrações de 30 e 100 μ M de L-cisteína e, parcial para a concentração de 300 μ M de L-cisteína, conforme ilustrado na Figura 16 B. Por outro lado, os vasos tratados somente com DTNB (100 μ M) ou PBS não manifestaram nenhum efeito de vasorelaxamento.

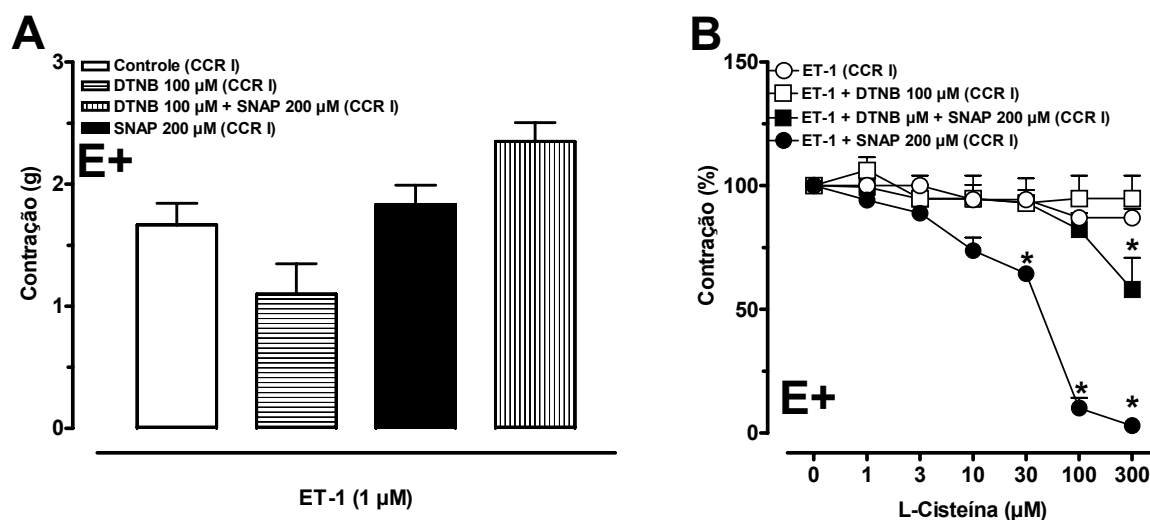


Figura 16. Efeito da pré-exposição de anéis de aorta com endotélio ao DTNB e SNAP sobre as contrações induzida por endotelina e a resposta promovida por L-cisteína. Curvas concentração-resposta (CCR) para endotelina (ET-1; Figura 16A) e para L-cisteína (Figura 16B) em vasos pré-contráídos com ET-1 e, expostos ao DTNB, SNAP e PBS (controle). A indicação gráfica E+ corresponde à presença de endotélio. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. * $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de uma via seguido de teste t de Bonferroni.

4.13. Análise do efeito do DTNB sobre o relaxamento induzido pelo SNAP e do efeito do DTNB em vasos pré-incubados com SNAP

Conforme os dados demonstrados na Figura 17A, obtidos de vasos com endotélio, o DTNB (100 µM) não afetou a curva de relaxamento para o SNAP (1, 3, 10, 30, 100 e 300 nM), quando comparado a curva controle, proveniente de vasos incubados com o PBS. Na Figura 17B, a comparação com o grupo controle, demonstra que a administração de concentrações crescentes de DTNB (1, 10 e 100 µM) não alterou a resposta contrátil para fenilefrina em anéis de aorta com endotélio, previamente incubados com SNAP (200 µM). Os dados da Figura 17B também mostram que não houve relaxamento da contração para fenilefrina em vasos incubados previamente com PBS.

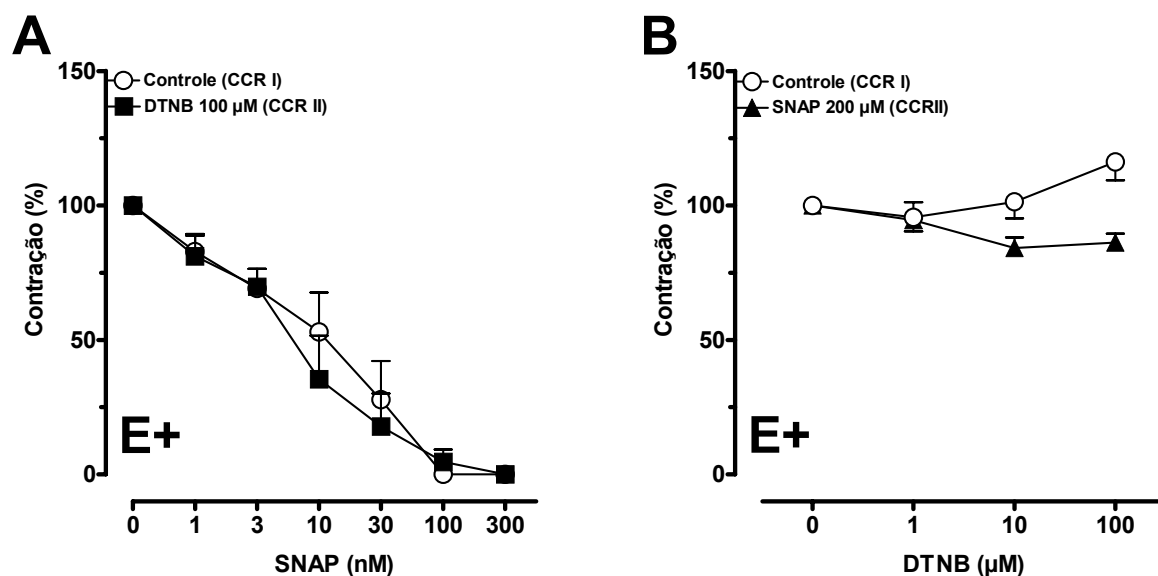


Figura 17 - Efeito do DTNB sobre o relaxamento induzido pelo SNAP e o efeito do DTNB após a incubação com SNAP em anéis com endotélio pré-contraídos com fenilefrina. Curvas concentração-resposta (CCR) para SNAP em vasos pré-contraídos com fenilefrina e, expostos ao DTNB e PBS (controle; Figura 17A). CCR para DTNB em vasos pré-contraídos com fenilefrina e, expostos ao SNAP e PBS (controle; Figura 17B). A indicação gráfica E+ corresponde à presença de endotélio. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. $P > 0,05$, estatisticamente sem diferença (CCR I *versus* CCR II), teste *t* de Student não-pareado.

4.14. Efeito da pré-exposição a diamida sobre o relaxamento causado pela L-cisteína em anéis de aorta com endotélio incubados com o SNAP

Conforme detalhado na seção de Material e Métodos, esta série de experimentos foi executada de forma semelhante aos experimentos realizados com DTNB, SNAP e L-cisteína. A presente avaliação revelou que a prévia exposição das preparações a 100 e 200 μM de diamida, não interferiu no vasorelaxamento evocado pela L-cisteína após a incubação com SNAP.

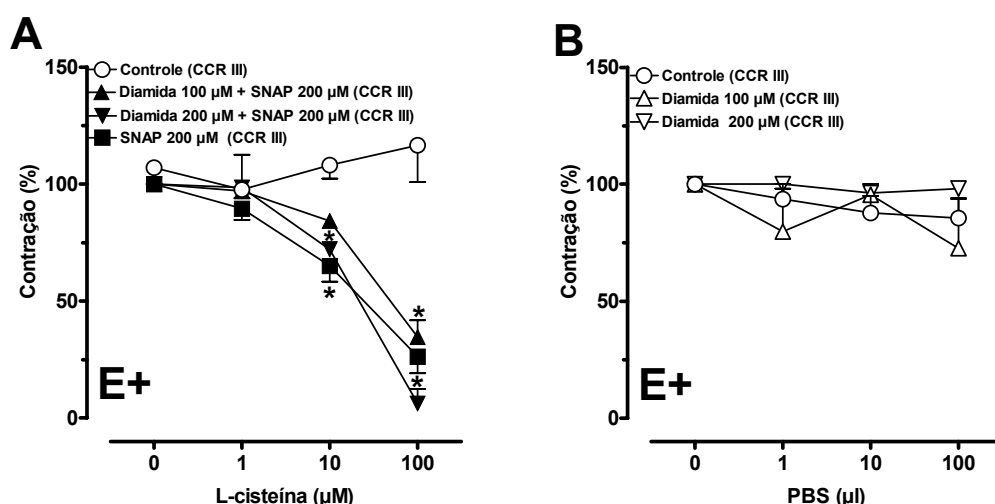


Figura 18 - Efeito da pré-exposição a diamida sobre relaxamento causado pela L-cisteína em anéis de aorta com endotélio incubados com o SNAP. Curvas concentração-resposta (CCR) para L-cisteína em vasos pré-contraídos com fenilefrina e expostos a diamida, SNAP e PBS (controle). A indicação gráfica E+ corresponde à presença de endotélio. Cada ponto representa a média de 4 a 10 experimentos, e as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m., * $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de uma via seguido de teste t de Bonferroni.

4.15. Efeito do DTNB sobre a hiporeatividade à fenilefrina induzida por SNAP em ratos anestesiados

Os resultados apresentados na Figura 19 corroboram com os dados obtidos previamente por Silva-Santos e colaboradores (2000), nos quais a infusão de SNAP (85 nmol/Kg/min) por um período de 30 min, reduziu a resposta pressórica para a fenilefrina (1, 3 e 30 nmol/Kg) significativamente em ratos anestesiados (Figura 19A).

A hiporeatividade à fenilefrina foi totalmente inibida com a pré-infusão de DTNB (63 μ mol/Kg; *i.v.*), conforme também demonstrado na Figura 19A. Em outra série de experimentos, o DTNB (63 μ mol/Kg; *i.v.*) foi administrado após a avaliação da presença da hiporeatividade à fenilefrina e, este agente também foi eficaz em reverter a redução da pressão arterial média α -adrenérgica.

A Figura 19B apresenta os valores pressóricos para fenilefrina de experimentos controle, os quais demonstram que as condições experimentais

realizadas não alteraram a pressão arterial média para fenilefrina ao longo do tempo (CDR I *versus* CDR II DTNB ou PBS).

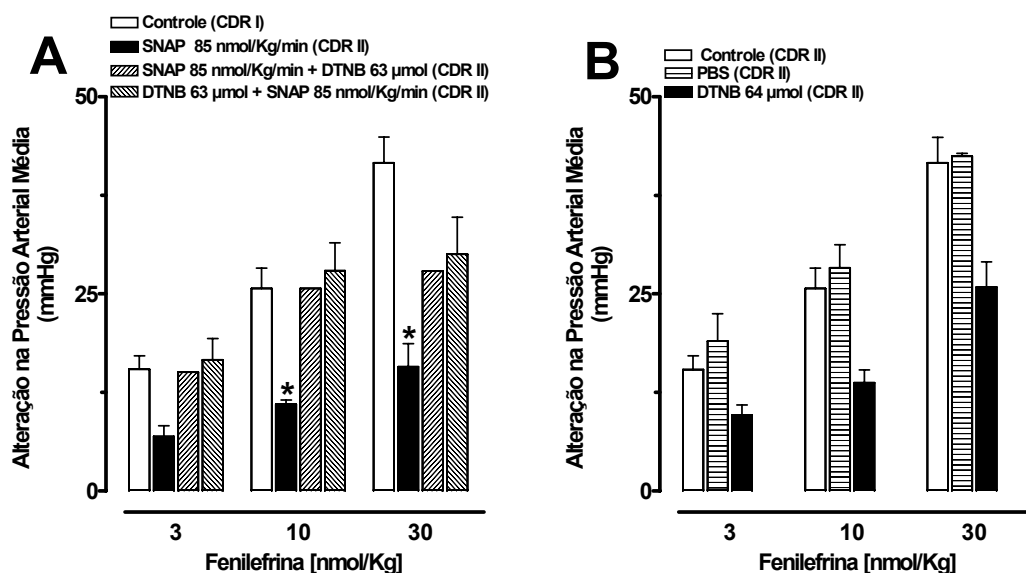


Figura 19 - Efeito do DTNB sobre a hiporeatividade à fenilefrina induzida pelo SNAP em ratos anestesiados. Curvas dose-resposta para fenilefrina antes (CDR I) e após a infusão de SNAP, DTNB e PBS (CDR II) em ratos anestesiados sobre a alteração na pressão arterial média (Figura 19A e 19B). Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos e, as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. * $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de duas vias seguido de teste t de Bonferroni.

4.16. Efeito do DTNB em modelos endotoxêmicos de hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo LPS em anéis de aorta e a sobrevida de camundongos tratados com *E. coli*

No modelo *in vitro*, após a incubação dos vasos com endotélio por 8 horas com LPS (10 µg/ml; $0,36 \pm 0,03$ g; CCR II), o DTNB (10 e 100 µM) reverteu a hiporeatividade à fenilefrina ($0,62 \pm 0,05$ g para 10 µM e $0,70 \pm 0,09$ g para 100 µM; CCR III), quando analisado em conjunto com o controle ($0,80 \pm 0,05$ g; CCR I: Figura 20A). Já no modelo *ex vivo*, em anéis sem endotélio retirados de animais tratados com 5 e 12,5 mg/Kg de LPS (*i.p.*; 8 horas), as R_{\max} para fenilefrina foram significativamente reduzidas para $0,51 \pm 0,06$ e

0,55 \pm 0,08 g (CCR I), respectivamente, e a incubação destes vasos com o DTNB (100 μ M; 15 min) reverteu a hiporeatividade à fenilefrina para 0,88 \pm 0,11 g (LPS 5 mg/Kg; CCR II) e 0,70 \pm 0,09 g (LPS 12,5 mg/Kg; CCR II; Figura 20B e 20 C). Conforme também mostrado na Figura 20B e 20 C, os anéis de aorta sem endotélio de animais que receberam o tratamento com LPS (5 mg/Kg ou 12,5; *i.p.*; 8 horas) e DTNB (administrado pela via s.c. 4 e 6 horas após o LPS) não manifestaram a hiporesponsividade à fenilefrina quando comparado ao controle, expressando os seguintes valores para as R_{máx}: 0,68 \pm 0,03 g (LPS 5 mg/Kg e DTNB 12,5 mg/Kg; CCR I) e 0,92 \pm 0,08 g (LPS 12,5 mg/Kg e DTNB 12,5 mg/Kg; CCR I). Com relação aos grupos controles, as R_{máx} antes (0,80 \pm 0,05 g; CCR I) e 8 horas após a cicloheximida (10 μ M) e DTNB (100 μ M; CCR II: 0,62 \pm 0,05 e CCR III: 0,70 \pm 0,09 g) não demonstraram diferenças estatísticas.

A administração de *E. coli* viável (1 \times 10⁹ unidades/animal; *i.p.*) em camundongos ocasionou a manifestação de alguns sinais fisiopatológicos, como a piloereção, letargia e taquicardia na maioria dos animais, já nas primeiras horas após a injeção da bactéria, caracterizando o choque endotoxêmico. Já os animais endotoxêmicos tratados com DTNB apresentaram estes sinais em menor intensidade, com notável aumento da atividade motora dos animais (dados não demonstrados). A figura 20D mostra que o tratamento somente com *E. coli* reduziu em 60 % a sobrevivência dos animais, já nas primeiras 48 horas após a administração da bactéria e, esta porcentagem manteve-se estável até quinto dia de experimento. Por outro lado, os animais que receberam DTNB e *E. coli* mostraram 80% (para DTNB 25 mg/Kg; T0) e 90% (para DTNB 10 mg/Kg; T12/12) de sobrevivência. Nos animais que receberam PBS (150 μ l) e DTNB (25 mg/Kg) não houve mortes durante os 5 dias de avaliação.

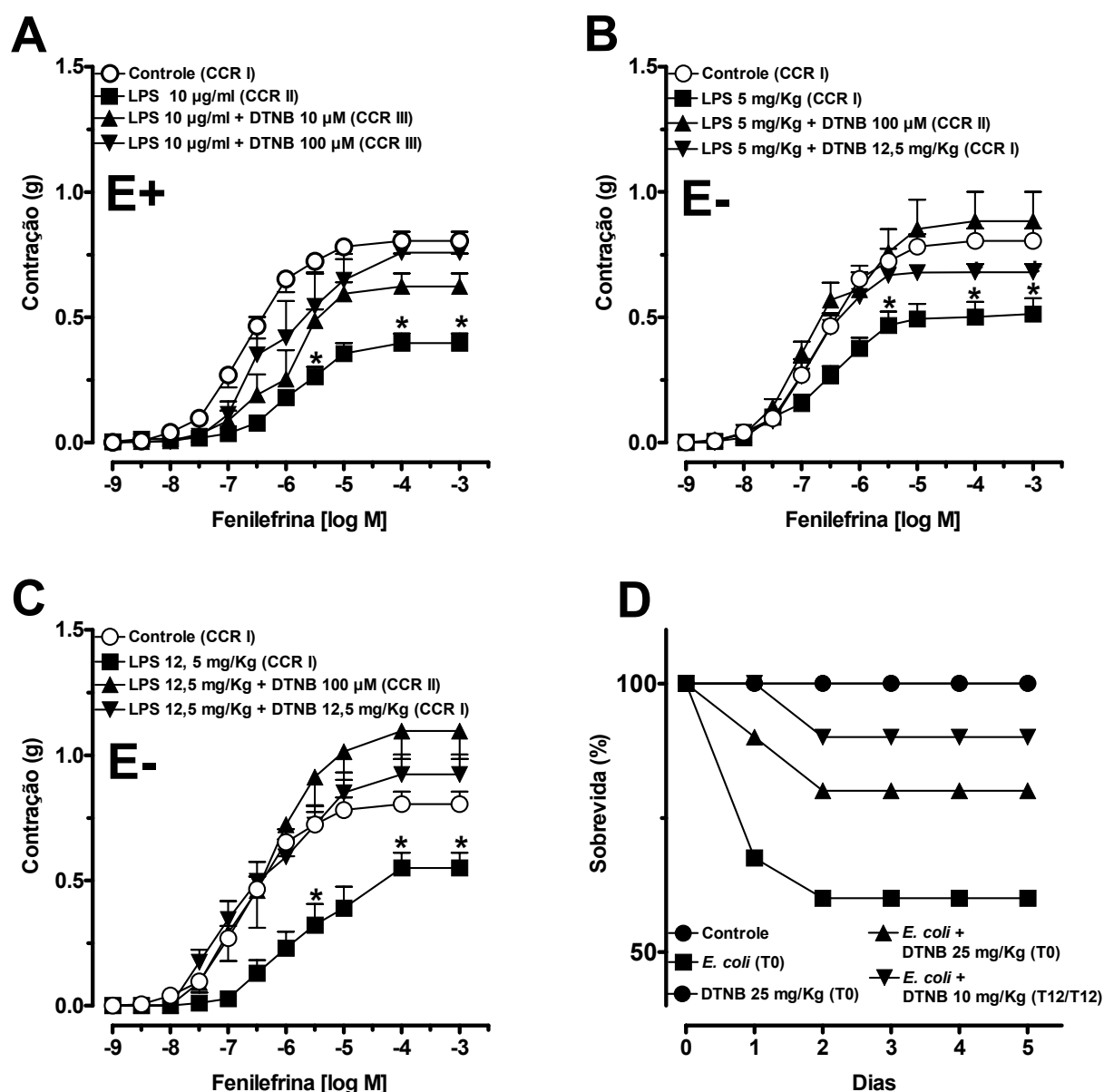


Figura 20 - Efeito do DTNB em modelos de endotoxemia. As Figuras 20A, 20B e 20C mostram o efeito do DTNB sobre a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina induzida pelo LPS em anéis de aorta com (Figura 20A) e sem endotélio (Figura 20B e 20 C), no modelo *in vitro* (Figura 20A) e *ex vivo* (Figura 20B e 20 C). Curvas concentração-resposta para fenilefrina com ou sem a exposição dos vasos (Figura 20A) ou o tratamento dos animais (Figura 20B e 20C) com o LPS e DTNB (CCR I e CCR II). A indicação gráfica E+ e E- corresponde à presença ou a ausência de endotélio, respectivamente. Cada ponto representa a média de 5 a 10 experimentos, e as linhas verticais dos símbolos representam o e.p.m. * $P < 0,05$, estatisticamente diferente, ANOVA de duas vias seguido de teste *t* de Bonferroni. A figura 20D demonstra o efeito

do DTNB sobre a sobrevivência de camundongos tratados com *E. coli* (1×10^9 unidades/animal de bactérias viáveis). Os valores expressos em porcentagem (%) de sobrevivência dos animais; o tempo de duração do teste foi de 5 (cinco) dias; cada ponto expressa a média de 10 a 20 animais; e as diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste Logrank (teste do qui-quadrado).

4.17. Análise dos mecanismos envolvidos na resposta induzida pela L-cisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP

Parte deste estudo analisou os mecanismos envolvidos no vasorelaxamento mediados pela L-cisteína associado a pré-incubação dos vasos com o SNAP. É importante ressaltar que a avaliação do relaxamento para L-cisteína foi realizada 60 min após a exposição vascular ao SNAP, caracterizado um evento vascular como de longa duração. De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, a inibição da guanilato ciclase através do ODQ ($10 \mu\text{M}$) bloqueou significativamente o relaxamento evocado pela L-cisteína (1 , 10 e $100 \mu\text{M}$) após o SNAP, em vaso com e sem endotélio. De fato, na presença de endotélio, a inibição mediada pelo ODQ foi menor, quando comparado com o vasorelaxamento obtido a partir de anéis sem endotélio. Enquanto isso, a inibição da PKG e PKA, com o KT 5823 ($1 \mu\text{M}$) e KT 5720 ($1 \mu\text{M}$), respectivamente, não alterou o relaxamento para L-cisteína em vasos pré-incubados com SNAP.

Na sequência deste estudo, o bloqueio de K_v , com a 4-aminopiridina (1mM) e de K_{ATP} , com a glibenclamida ($10 \mu\text{M}$) não alterou o relaxamento produzido pelo co-tratamento vascular com SNAP e L-cisteína. De forma semelhante, o bloqueio de IK_{Ca} e BK_{Ca} , como o clotrimazol ($10 \mu\text{M}$) e a caribdotoxina (100 nM), respectivamente, não afetou o vasorelaxamento mediado pela L-cisteína após o SNAP. Da mesma forma, que o uso de um bloqueador de canais de K^+ não-seletivo, o TEA (10 mM), também não inibiu o relaxamento. Finalmente, a adição de 80 mM de KCl causou significativa contração dos vasos com endotélio ($1,59 \pm 0,2 \text{ g}$) e aboliu completamente o relaxamento evocado pela L-cisteína, após o tratamento com o SNAP. Com relação ao efeito destes compostos sobre a contração induzida pela fenilefrina, a Tabela 2 mostra que nenhum destes agentes não alteraram a resposta α -adrenérgica.

Tabela 3 - Efeito de compostos na resposta induzida por L-cisteína em anéis de aorta expostos ao SNAP. Curvas concentração-resposta para L-cisteína (CCR I) em anéis com (E+) e sem (E-) endotélio.

CCR I	L-cisteína 1 μ M R _{máx} (%)	L-cisteína 10 μ M R _{máx} (%)	L-cisteína 100 μ M R _{máx} (%)
E+ Controle	96,7 \pm 5,0	105,4 \pm 7,3	116,8 \pm 22,2
E- Controle	93,5 \pm 6,6	103,0 \pm 6,8	86,3 \pm 9,8
E+ SNAP 200 μ M	89,5 \pm 4,7	65,0 \pm 6,6*	26,2 \pm 7,0 [§]
E- SNAP 200 μ M	66,3 \pm 7,8 [#]	43,6 \pm 7,7*	16,9 \pm 6,9 [§]
E+ SNAP 200 μ M + ODQ 1 μ M	95,1 \pm 1,4	85,6 \pm 4,8	65,3 \pm 7,5
E- SNAP 200 μ M + ODQ 1 μ M	101,4 \pm 1,4	98,6 \pm 1,3	96,0 \pm 4,1
E+ SNAP 200 μ M + KT 5823 1 μ M	98,5 \pm 1,4	69,0 \pm 12,1*	1,6 \pm 1,6 [§]
E+ SNAP 200 μ M + KT 5720 1 μ M	103,3 \pm 3,3	105,3 \pm 5,3	24,3 \pm 7,2 [§]
E+ SNAP 200 μ M + TEA 10 mM	99,1 \pm 3,8	66,7 \pm 6,5*	26,3 \pm 10,3 [§]
E+ SNAP 200 μ M + 4-aminopiridina 1mM	93, \pm 6,2	73,8 \pm 9,2*	41,9 \pm 8,3 [§]
E+ SNAP 200 μ M + Glibenclamida 10 μ M	97,4 \pm 2,5	85,4 \pm 3,6	26,4 \pm 10,3 [§]
E+ SNAP 200 μ M + Clotrimazol 10 μ M	100,0 \pm 0,0	81,2 \pm 0,6*	30,9 \pm 8,0 [§]
E+ SNAP 200 μ M + Caribdotoxina 100 nM	75,4 \pm 32,6	60,0 \pm 31,5	7,1 \pm 7,1 [§]
E+ SNAP 200 μ M + KCl 80 mM	100,0 \pm 0	105,4 \pm 2,9	104,3 \pm 3,6
E+ ODQ 1 μ M	102,5 \pm 1,7	103,1 \pm 1,9	98,6 \pm 6,4
E- ODQ 1 μ M	102,5 \pm 1,7	103,1 \pm 1,9	98,6 \pm 6,4
E+ KT 5823 1 μ M	102,3 \pm 2,3	96,0 \pm 6,1	95,5 \pm 8,5
E+ KT 5720 1 μ M	98,5 \pm 3,7	95,0 \pm 5,1	92,5 \pm 6,6
E+ TEA 10 mM	101,7 \pm 1,2	105,0 \pm 2,6	106,8 \pm 3,0
E+ 4-aminopiridina 1mM	96,8 \pm 4,7	95,3 \pm 6,0	96,1 \pm 6,8
E+ Glibenclamida 10 μ M	100,0 \pm 0,0	98,6 \pm 2,3	90,2 \pm 3,4
E+ Clotrimazol 10 μ M	100,0 \pm 0,0	102,3 \pm 1,1	103,5 \pm 0,2
E+ Caribdotoxina 100 nM	104,0 \pm 6,0	100,0 \pm 2,6	102,0 \pm 5,1
E+ KCl 80 mM	100,0 \pm 0,0	97,2 \pm 3,2	97,2 \pm 3,2

Os resultados representam a média \pm e.p.m. de 5 a 10 experimentos individuais por grupo. As diferenças estatísticas para cada dose de L-cisteína foram determinadas através do teste de ANOVA de uma via seguido de teste *t* de Bonferroni ($P < 0,05$) grupo controle (E+ ou E-) *versus* o grupo tratado com o composto e/ou SNAP e, foram representadas pelos símbolos *, # e [§].

5. DISCUSSÃO

Várias evidências têm sugerido que a homeostasia do sistema cardiovascular é estabelecida pelo equilíbrio da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, que determinam o tônus dos vasos sangüíneos, a pressão arterial e a pressão de perfusão tecidual sistêmica. A alteração da liberação endógena de substâncias vasoativas tem sido associada a várias condições patológicas, como na hipertensão decorrente da excessiva estimulação do sistema renina-angiotensina e a produção do potente vasoconstritor angiotensina II (Zusman, 1987). Já a acentuada produção de substâncias vasodilatadoras pode superar a atividade dos agentes vasopressores, deflagrando a vasodilatação e a hipotensão, como ocorre no choque séptico e, em outras condições patológicas de relevância clínica (Moncada et al., 1991). Na sepse sabe-se que, apesar da expressiva vasodilatação sistêmica com simultânea redução da resposta a estímulos vasoconstritores que ocorre particularmente na microcirculação, existem focos de vasoconstrição gerando hipoperfusão tecidual (Heyman et al., 2000).

No choque séptico em humanos e no choque endotoxêmico em modelos animais, além da hipotensão severa decorrente da vasodilatação produzida principalmente pela maciça liberação de NO, encontra-se também o fenômeno de hiporeatividade a vasoconstritores (Fleming et al., 1991; Wong et al. 1995, Silva-Santos et al., 2002). Nas últimas décadas, vários estudos dedicaram-se a investigação da hiporeatividade a vasoconstritores e do vasorelaxamento, eventos relacionados com a grave hipotensão existente no choque séptico. Algumas evidências sugerem que o complexo mecanismo de sinalização envolvido na hiporeatividade a vasoconstritores, pode estar dissociado ao mecanismo indutor do vasorelaxamento.

Como exemplo, o NO induz hiporeatividade vascular à fenilefrina, angiotensina I e II, aumento do vasorelaxamento para bradicinina e acetilcolina, mas não para iloprost e SNP (Silva-Santos e Assreuy, 1999). Deste modo, dependendo dos agonistas ou compostos em estudo, a hiporeatividade e o hiper-relaxamento podem ocorrer simultaneamente, ou de forma isolada,

sugerindo a participação de mecanismos independentes entre estes eventos vasculares. Porém, esta questão não está totalmente esclarecida na literatura. Parte deste trabalho investiga a hiporeatividade a vasoconstritores e o vasorelaxamento associados ao NO, através de modelo *in vitro* de exposição vascular a doadores de NO.

Em estudos prévios demonstramos que a incubação de doadores de NO (SNP e SNAP) durante 30 min induziu o efeito de hiporeatividade de longa duração para fenilefrina, em anéis de aorta de rato sem endotélio. A hiporeatividade α -adrenérgica foi avaliada até 2 horas e 10 min após a exposição dos vasos aos doadores de NO e, caracterizou-se pela marcante diminuição das R_{\max} das CCR para fenilefrina (Terluk et al., 2000). Já a infusão de SNAP e SNP em ratos anestesiados reduziu o efeito pressórico para fenilefrina, causando persistente hiporeatividade até 24 horas após a administração *per se* (Silva-Santos e Assreuy, 1999). Alguns doadores de NO, como os nitratos orgânicos e SIN-1, promovem a formação de ONOO⁻ (a partir da reação de NO com O₂⁻), que contribui para a oxidação do LDL (lipoproteína de baixa densidade) em células endoteliais e células da musculatura lisa vascular. No entanto, existem evidências substanciais que o SNAP e outros S-nitrosotióis não causam este tipo de estresse oxidativo (Jaworski et al., 2001). Assim, é possível inferir que o efeito de hiporeatividade avaliado no presente trabalho não está associado ao estímulo oxidativo de LDL no tecido vascular. Ademais, a molécula não-nitrosilada presente no SNAP, o N-acetil-DL-penicilamina (NAP), não causou efeito vascular sobre a resposta α -adrenérgica e, os resultados obtidos com SNAP foram atribuídos exclusivamente ao efeito do NO (Terluk et al., 2000). É importante destacar que no presente trabalho: i) a persistente inibição da contração à fenilefrina em tecido arterial foi obtida 60 min após a exposição dos vasos ao SNAP e o GTN; ii) a hiporeatividade à fenilefrina obtida com SNAP em vasos com e sem endotélio, resultou em um perfil também dependente da concentração; e iii) a hiporeatividade induzida pelo SNAP manifestou menor intensidade em artérias com a camada endotelial preservada, indicando um efeito protetor do endotélio sobre o músculo liso.

Outros estudos constataram um efeito prolongado do doador de NO, RIG200, no tecido venoso humano com dano endotelial e, estas investigações sugerem que estes achados podem ter aplicações importantes na clínica em patologias cardiovasculares, em que existe menor biodisponibilidade do NO (Sogo et al., 2000b). Em outros estudos, o efeito protetor do endotélio sobre a musculara lisa vascular também está presente no estresse oxidativo promovido pelo H_2O_2 (Linás e Repine, 1997). Por outro lado, em estudos *in vitro* com LPS, à presença da camada endotelial reduz o tempo de desenvolvimento da hiporeatividade à noradrenalina (Nakaki et al., 1992; Fleming et al., 1993). Já em um modelo *ex vivo*, o pré-tratamento de animais com LPS (20 mg/Kg; *i.p.*; 4 horas) reduz a contração máxima para noradrenelina em anéis de aorta com e sem endotélio para valores semelhantes, 43 e 54%, respectivamente (Julou-Schaeffer et al., 1990). Entretanto, alguns dados da literatura evidenciam que as estratégias clínicas de prevenção e reversão da disfunção endotelial podem auxiliar o prognóstico de patologias cardiovasculares. Como exemplo, a infusão de vitamina C diminui a hiporeatividade a acetilcolina em estudos clínicos, demonstraram que a atividade antioxidante reverte a disfunção endotelial no processo inflamatório agudo (Pleiner et al., 2002). Ademais, a disfunção endotelial presente no choque séptico é, em parte, decorrente da alta produção de NO pela iNOS, e tem sido relacionada com a patogênese da falência do sistema cardiovascular (Vallance e Moncada, 1993; Thiemermann, 1997). Estudos com animais geneticamente modificados, constataram que a iNOS participa da disfunção endotelial em vasos de resistência e condutância (Chauhan et al., 2003).

O presente estudo também analisa a participação de mediadores derivados das células endoteliais, como um possível mecanismo no desenvolvimento do efeito protetor do endotélio. Em células endoteliais, a atividade da mitocôndria (Salvemini e Cuzzocrea, 2002) e da eNOS (Stroes et al., 1998) entre outros processos biológicos, produzem o O_2^- , que está associado ao estresse oxidativo através da reação desta molécula com o NO gerando o ONOO- (McIntyre et al., 1999). Por outro lado, a reação do NO com o O_2^- também reduz a atividade vasodilatadora do NO (Gryglewski et al., 1986;

Rubanyi e Vanhoutte, 1986). Deste modo, o presente trabalho analisou a possível participação do O_2^- , no efeito protetor endotélio. Nossos resultados indicam que os sequestradores de O_2^- extracelular e intracelular (a SOD e o MnTBAP, respectivamente) não modificaram o efeito do SNAP na contração vascular, descartando a contribuição do O_2^- no efeito protetor do endotélio.

Diversos estudos demonstraram que as células endoteliais liberam várias substâncias com propriedades vasoativas como a endotelina, que exerce um papel fundamental na regulação do tônus vascular através da ativação de receptores ET_A e ET_B , e subtipos ET_{B1} e ET_{B2} . Os receptores ET_A e o ET_{B2} localizados na musculatura lisa vascular deflagram a vasoconstrição e, o ET_A das células endoteliais ocasionam a breve vasodilatação através da produção de NO e prostaglandinas (Haynes e Webb, 1998; Wanecek et al., 2000). Nossos resultados mostram que o bloqueio de receptores ET_A , com o BQ123, não interferiu na atividade protetora do endotélio sobre o efeito do SNAP na hiporeatividade vascular, indicando que o sistema endotelina, via receptores ET_A , não participa deste efeito.

Tem sido demonstrado que os sistemas enzimáticos da COX e da lipooxigenase, formam a partir do ácido araquidônico vários eicosanóides com propriedades vasoconstritoras (Filipeanu et al., 1998). De fato, o NO também é capaz de aumentar a atividade da COX-1 e COX-2 (Salvemini et al., 1993). A partir do ácido araquidônico, o sistema enzimático do citocromo P-450 também produz metabólitos com atividade vasoconstritora (Rahman et al., 1997). Em vista dos argumentos apresentados, procedeu-se o bloqueio da produção de mediadores vasoconstritores, utilizando indometacina (para COX-1 e COX-2), MK 886 (para lipooxigenase) e o clotrimazol (para citocromo P-450). Contudo, estes agentes não influenciaram na hiporeatividade associada ao SNAP, e portanto, na atividade protetora do endotélio.

A ECA encontra-se em vários tecidos e órgãos, incluindo o endotélio, catalisando a conversão de angiotensina I em um potente vasoconstritor, a angiotensina II (Riordan, 1995). Nossos resultados mostram que o pré-tratamento com captopril, um inibidor da ECA amplamente utilizado na clínica

para o tratamento de doenças cardiovasculares, também não alterou a atividade protetora do endotélio.

Por outro lado, o clotrimazol e o captopril aumentaram a vasoconstrição para fenilefrina em grupos controle. Tem sido sugerido que o clotrimazol inibe a formação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), um possível metabólito do citocromo P-450, com atividade vasodilatadora (Zygmunt et al., 1996) deflagrada pela abertura dos canais de K^+ , do subtipo K_v (Petersson et al., 1997). Além disso, o clotrimazol também é capaz de bloquear a atividade dos IK_{Ca} (Wulff et al., 2001). Desse modo, a potencialização da vasoconstrição para fenilefrina causada pelo clotrimazol envolve possivelmente a redução da vasodilatação promovida pelo EDHF e/ou o bloqueio da atividade dos IK_{Ca} . Com relação ao inibidor da ECA, foi demonstrado que o captopril também apresenta efeitos inespecíficos, como o aumento da síntese de prostaglandinas e a inibição da inativação da bradicinina (Zusman, 1987), os quais são potentes vasodilatadores. Assim, pode ser que o aumento da resposta vasoconstritora adrenérgica após o captopril, consista em uma eventual atividade não-específica da droga.

A eNOS tem sido alvo de vários estudos, tendo em vista que a atividade desta enzima regula por exemplo o tônus arterial e venoso (Ignarro et al., 1988). A adição de L-NAME inibe a síntese de NO liberada continuamente pela eNOS, aumentando a resposta contrátil para fenilefrina (Hamilton et al., 1997). Por outro lado, em células endoteliais, o próprio NO exerce um controle retroativo e inibitório sobre a atividade catalítica da eNOS (Buga et al., 1993). Parte deste estudo investigou a possível inativação da eNOS, causada pela exposição vascular ao NO exógeno (SNAP), implicando no efeito protetor do endotélio e no aumento da resposta contrátil à fenilefrina. Entretanto, os resultados funcionais obtidos através da avaliação do relaxamento exercido pela acetilcolina, um vasodilatador dependente da atividade da eNOS e da produção de NO, evidenciam que o SNAP não alterou a atividade da eNOS.

A remoção do endotélio leva a potencialização do efeito de vasorelaxamento para agentes como o nitrito de sódio ($NaNO_2$) e o SNP (Shirasaki e Su, 1985). Já os dados da presente investigação reportam que, a

remoção do endotélio potencializa o efeito da hiporeatividade a vasoconstritor. Em conjunto, os resultados apresentados também mostraram que o efeito protetor do endotélio sobre a prolongada hiporeatividade à fenilefrina mediada pelo NO não está associada a produção de O_2^- , angiotensina II, endotelina (via receptores ET-A), produtos derivados das enzimas COX, lipooxigenase, citocromo P-450 e eNOS (Terluk, et al., 2004).

Conforme descrito anteriormente, evidências vêm mostrando que a sensibilização da resposta da via NO/GMPc pode ser ocasionada pela remoção da camada endotelial (Friebe e Koesling, 2003). Estes dados, associados ao presente resultado de potencialização da hiporeatividade na ausência do endotélio, é possível inferir que, este evento pode estar relacionado a sensibilização da via NO/GMPc.

Diversas evidências sugerem que a interação do NO com grupamentos sulfidrilas de tióis em proteínas, promove a formação dos S-nitrosotióis (Broillet, 1999), que exercem um importante papel na reatividade vascular (Muller et al., 2002). Vários estudos tem demonstrado que os S-nitrosotióis agem como reservatórios de NO e como um sistema tampão desta molécula, controlando a magnitude da ação do NO, no meio intra e extracelular (Stamler et al., 2001).

Sabe-se que o NO apresenta uma meia-vida biológica curta (Moncada et al., 1991), porém, o NO presente nos S-nitrosotióis pode ser liberado gradativamente gerando efeito sustentado, como a vasodilatação e a diminuição da reatividade vascular (Megson et al., 1997; Megson et al., 1999; Sogo et al., 2000a). A exposição do tecido vascular aos doadores de NO, como os S-nitrosotióis exógenos, resulta na reação de S-nitrosilação e, em uma nova formação de S-nitrosotióis endógenos ligados à proteínas (Butler e Rodes, 1997). Dados da literatura sugerem que a persistente hiporeatividade à fenilefrina mediada pelo NO depende da prévia formação de S-nitrosotióis (Silva-Santos e Assreuy, 1999, Terluk et al., 2000). Alencar e colaboradores (2003b) reportaram que a S-nitrosilação de resíduos de cisteína participam do persistente efeito do NO sobre o tônus vascular. Os mesmos autores demonstram que o SNAP, SNP, GSNO e S-nitrosoacetilcisteína (1 μ M) reduzem de maneira persistente a contração em artérias isoladas. No entanto,

a S-nitrosocisteína, SIN-1, 2-(dietilamino)-diazenolato-2-óxido (DEA-NO) e o GTN (1 μ M) não exibiram a mesma atividade. Estes achados foram relacionados com a capacidade dos doadores de NO em transferir NO^+ para tióis presentes no tecido vascular, resultando na S-nitrosilação (Alencar et al., 2003b). Além disso, estudos com dietilmaleato, um agente que depleta GSH tecidual, mostram que o vasorelaxamento causado pelo ONOO^- é mediado pela prévia S-nitrosação de GSH e, posterior liberação do NO por período prolongado (Wu et al., 1994a). Em contraste, a formação de ONOO^- no tecido vascular, através da adição de SIN-1 (70 e 200 μ M), não causou a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina (Terluk et al., 2000).

O presente estudo mostra que o GTN na concentração de 200 μ M, assim como o SNAP, induz hiporeatividade α -adrenérgica, porém, em menor magnitude que o SNAP. O SNAP libera NO^\cdot que pode receber um elétron livre, gerando o NO^+ (Soúleret et al., 2001), que consiste na forma preferencial de formação de S-nitrosotióis (Gaston, 1999). Já o GTN é considerado um doador de NO^\cdot (Feelisch, 1998) com alta afinidade à enzima guanilato ciclase solúvel. Em análises de vasorelaxamento, o OEQ inibiu completamente o efeito do GTN e, parcialmente o relaxamento produzido pelo SNAP, demonstrando a participação de mecanismos de sinalização distintos entre os doadores de NO em estudo (Van der Zyppe e Majewski, 1998). Entretanto, o relaxamento arterial causado pelo SNAP e GTN ocorrem através da ativação de BK_{Ca} (Ishibashi et al., 1995; Bialecki e Stinson-Fisher, 1995).

Em conjunto aos resultados principais, o presente trabalho também demonstra que o efeito oxidante do DTNB previne a hiporeatividade à fenilefrina de longa duração induzida pela exposição vascular ao SNAP. A análise dos resultados obtidos evidenciam que o DTNB demonstrou maior eficácia em prevenir a hiporeatividade à fenilefrina em preparações sem endotélio, e portanto, em condição vascular que existe maior intensidade no efeito do NO. O DTNB é um potente agente oxidante de grupamentos sulfidrilas, que não permeia as membranas celulares, utilizado amplamente para determinação de grupamento sulfidrilas livre e ligado a estrutura molecular de baixo e alto peso, como as proteínas e os peptídeos (Ellman, 1959;

Zoccarato et al.,1999). Estes achados sugerem que o efeito do DTNB na hiporeatividade, depende de grupamentos sulfidrilas presentes no tecido vascular e, em especial na musculatura lisa vascular. Além do efeito de prevenção da hiporeatividade após o SNAP, o efeito oxidante do DTNB também foi capaz de reverter a hiporeatividade exercida pelo GTN em vasos com endotélio. É importante destacar também que o DTNB não alterou a resposta contrátil para a fenilefrina, indicando que a ação oxidante do DTNB não interfere com a ligação da fenilefrina ao seu receptor e, no mecanismo de sinalização α -adrenérgica. Já no decurso temporal de experimentos controles de vasos com endotélio, registrou-se discreta potencialização das resposta para fenilefrina. Estes dados foram obtidos na presença de dexametasona e, na ausência de indometacina. Os glicocorticóides não afetam a síntese de mediadores derivados da COX-1, mas inibe a expressão de COX-2 (Masferrer e Seibert, 1994) e iNOS (Rees et al., 1990). Várias evidências têm demonstrado o envolvimento da COX-1 na modulação de funções fisiológicas e, da COX-2 em reações fisiopatológicas, como a inflamação (Masferrer e Seibert, 1994), porém, a COX-2 é expressa constitutivamente em alguns tecidos e, participa especialmente de processos de dor e febre (Needleman e Isakson, 1997). Portanto, é possível que parte do aumento da resposta contrátil para fenilefrina, seja decorrente da produção de mediadores vasoconstritores derivados da COX-1 nas células endoteliais, e adicionalmente outras vias já citadas.

Dados complementares mostraram que a prevenção da hiporeatividade à fenilefrina mediada pelo SNAP também ocorre através de um outro agente oxidante, a diamida. Analisando em conjunto aos resultados anteriores, a concentração de diamida capaz de inibir totalmente a hiporeatividade vascular, foi 20 vezes superior, à menor concentração efetiva do DTNB. Por outro lado, a inibição da instalação da hiporeatividade vascular com a diamida foi investigada somente em vasos com endotélio. Diante da influência da camada endotelial na hiporeatividade causada pelo NO, experimentos complementares em vasos sem endotélio podem melhor avaliar a efetiva capacidade da diamida em prevenir o efeito do NO. Sabe-se também que os níveis de GSH podem ser

determinados pela reação de oxidação da diamida (Adachi e Cohen, 2000). Ressalta-se também que através de mecanismo oxidativo, a diamida, bem como o H_2O_2 , diminuem a probabilidade de abertura dos canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} (DiChiara e Reinhart, 1997), demonstrando que os aspectos químicos no balanço entre o estresse oxidativo e nitrosativo são importantes para a determinação da condutância iônica.

A modulação redox de resíduos de cisteínas, como por exemplo a interconversão entre tiol para disulfeto, tem sido proposto como um mecanismo bioquímico de ativação e desativação da função de proteínas (-SH e S-S, respectivamente). Todavia, as cisteínas em tióis podem sofrer múltiplas modificações redox, como a S-nitrosilação e a S-hidroxilação (S-OH). Por sua vez, as modificações redox participam da patogênese de várias doenças (por exemplo, inflamação em tecidos, infecções crônicas e processos degenerativos) e representam importantes alvos que podem ser melhor explorados. Além disso, as modificações do estado redox de resíduos de cisteína podem interferir na S-nitrosilação de proteínas, na formação de S-nitrosotióis e nas complexas respostas patofisiológicas associadas a estes compostos (Foster et al., 2003). A análise em conjunto dos resultados apresentados com os agentes oxidantes e os dados da literatura, permitem sugerir que o estresse oxidativo promove modificações redox nas membranas celulares que interfere, direta ou indiretamente, em nível molecular com a S-nitrosilação e, conseqüentemente, com o estado de hiporeatividade tecidual.

Diversas evidências sugerem a relevante participação dos S-nitrosotióis em condições fisiológicas e patológicas. Em níveis fisiológicos, os S-nitrosotióis contribuem para a homeostasia vascular, como por exemplo, através do vasorelaxamento determinado pela S-nitrosohemoglobina. Já a diminuição ou a elevação da concentração destes compostos ocasionam várias fisiopatologias (Broillet, 1999). Como exemplo, o choque séptico é uma síndrome caracterizada por hipotensão, hiporeatividade a vasoconstritores e hipoperfusão tecidual (Levy et al., 2003), em parte, decorrente da presença de S-nitrosotióis em altas concentrações no plasma e nos tecidos. Na sepse, como em outras patologias, a formação dos S-nitrosotióis está associada a

expressão da iNOS e a intensa síntese de NO (Foster et al., 2003). Além do choque séptico, o NO tem sido associado à hiporeatividade vascular presente no choque hemorrágico (Moochhala e Siew-Yang, 2003) e na cirrose (Blendis e Wong, 2001).

Outros estudos relatam que em processos de S-nitrosação, a ligação específica S-NO pode ser quebrada por intermédio do DTT (Gow et al., 2002). Por sua vez, o DTT é apontado como um reagente modificador de tiol ou um redutor em altas concentrações, que não permeia as membranas celulares (Lal et al., 1996). Em nosso estudo, o DTT (100 μ M) não afetou a hiporeatividade arterial à fenilefrina produzida por SNAP e LPS (dados não demonstrados obtidos em ensaio experimental *ex vivo*). Tem sido demonstrado que o estresse oxidativo participa da alteração hemodinâmica presente no choque séptico, porém o uso de antioxidante não melhora efetivamente este quadro (Galley et al., 1997). Entretanto, recente estudo mostra que a infusão de ascorbato (200 mg/Kg), reduz os níveis plasmáticos de NO_2^- e NO_3^- e da proteína carbonil (*i.e.* índice de estresse oxidativo) e aumenta a sobrevivência de camundongos no modelo CLP (Wu et al., 2004).

A S-nitrosação de resíduos de cisteína exerce um importante papel na sinalização do NO e, é um mecanismo de estoque de NO em tecidos (Broillet, 1999). Vários estudos indicam que a nitrosação e a denitrosação de proteínas, representam importantes mecanismos de sinalização em células de vasos (Hoffmann et al., 2001). Já a reação de transnitrosação, consiste na transferência de NO entre resíduos de cisteína, que envolve tanto a formação, quanto a destruição de S-nitrosotióis. Portanto, os S-nitrosotióis de baixo peso molecular podem transferir o NO para resíduos de cisteínas (Arnette e Stamler, 1995) e, os tíois de baixo peso molecular podem retirar o NO, a partir de S-nitrosoproteínas, formando o S-nitrosotióis de baixo peso molecular como composto intermediário e, posteriormente transferir o NO para diferentes alvos (Butler et al., 1995; Muller et al., 2002). Vários reagentes são capazes de deslocar o NO, a partir das ligações entre cisteína e o NO, como o N-acetilcisteína, outros tíois de baixo peso molecular (Stoclet et al., 1998; Muller et al., 2002) e o cloreto de mercúrio (HCl; Saville, 1958; Gow et al., 2002).

Nossas investigações também avaliaram a participação da S-nitrosação de resíduos de cisteína, no efeito vascular de longa duração produzido pelo NO. Assim, os vasos foram previamente expostos a doadores de NO e, posteriormente a tióis. De fato, a adição de L-cisteína e/ou N-acetilcisteína, causaram marcante vasorelaxamento após o SNAP. Similarmente a hiporeatividade à fenilefrina, as respostas para L-cisteína e N-acetilcisteína também foram detectadas 60 min após a prévia exposição vascular ao SNAP, caracterizando um efeito de vasorelaxamento de longa duração. Os dados apresentados demonstram a correlação entre hiporeatividade a vasoconstritor e o vasorelaxamento para tióis, em tecido arterial incubado com doadores NO. De acordo com os dados da literatura, os resultados de hiporeatividade e vasorelaxamento podem estar relacionados a S-nitrosação de resíduos de cisteína e a mobilização de NO, causando a redução do tônus vascular. Tais constatações estão de acordo com os dados apresentados na literatura, que demonstram que a persistente inibição da contração vascular e o relaxamento mediado por tióis (N-acetilcisteína e L-cisteína) são determinados pela pré-exposição ao GSNO e, estes efeitos foram atribuídos a S-nitrosilação de artérias sem endotélio, com subsequente liberação do NO (Alencar et al., 2003a). Sabe-se que a N-acetilcisteína é um composto antioxidante, doador de sulfidrilas e sequestrador O_2^- e NO, que reduz a formação de $ONOO^-$ e produz efeito protetor contra o estresse oxidativo, na isquemia e reperfusão (Cuzzocrea et al., 2000). Ensaio com choque endotóxico a N-acetilcisteína (150 mg/kg; *i.p.*) foi capaz de aumentar a sobrevivência dos animais, mediada pela modulação da produção de O_2^- e TNF- α por macrófagos (Victor et al., 1999).

A análise comparativa dos resultados do presente estudo revelou que a intensidade do relaxamento foi maior para L-cisteína em vasos sem endotélio. Estes dados reforçam evidências anteriores, que indicam que o aumento das respostas vasculares medidas pelo NO associa-se a ausência de endotélio. Além disso, experimentos complementares podem elucidar se a ausência da camada endotelial: i) facilita a mobilização de NO por tióis e efetivamente o vasorelaxamento, e/ou ii) interfere com a quantidade de reservas de S-nitrosotióis formados no tecido vascular. Por outro lado, ensaios adicionais que

avaliem a participação dos grupamento sulfidrilas das células endoteliais, no próprio efeito protetor do endotélio e no estresse nitrosativo, possivelmente serão de grande relevância no entendimento da interação fisiológica e fisiopatológica, entre a camada endotelial, a musculatura lisa vascular e a disfunção endotelial. Ressalta-se ainda que a detecção de proteínas S-nitrosiladas *in situ*, em compartimentos celulares e teciduais, tem sido considerada complexa, todavia, os ensaios com derivação de biotina e microscopia confocal demonstraram resultados promissores (Ckless, et al., 2004).

Ademais, os resultados descritos sugerem que o vasorelaxamento observado no presente estudo indica à presença de S-nitrosotióis no tecido vascular por período prolongado e, os tióis livres promovem a quebra da ligação S-nitrosotiol e a liberação do NO. Baseado nestas considerações e no intuito de depletar os estoques de NO, os vasos pré-incubados com SNAP foram submetidos a várias exposições à L-cisteína. Assim, observou-se um padrão similar de vasorelaxamento para L-cisteína até 240 min após o SNAP, sugerindo à presença de grandes reservas teciduais de NO.

É importante destacar que a L-cisteína e a N-acetilcisteína são tióis que podem ser captados por um sistema de transporte de aminoácidos aniônicos em células (Ruiz et al., 2003). No entanto, o presente trabalho demonstra a resposta vascular imediata causada por tióis, sugerindo que o vasorelaxamento associado ao SNAP e a L-cisteína ou N-acetilcisteína, expressa a mobilização de S-nitrosotióis de proteínas localizadas nas próprias membranas celulares.

Tem sido reportado que o NO liberado pelas células endoteliais é degradado em NO_2^- e, também acumula-se na forma de S-nitrosotióis de baixo peso molecular em aorta de rato, como o GSNO (Rodriguez et al., 2003). De fato, não se pode descartar a participação de S-nitrosotióis intracelulares nos eventos vasculares descritos no presente estudo. No entanto, em nossos resultados, a ausência de relaxamento em vasos controle expostos aos tióis livres, permite sugerir que a adição única de L-cisteína e N-acetilcisteína não libera os estoques de NO a partir dos S-nitrosotióis pré-formados enzimaticamente. Entretanto, a partir da quarta exposição dos vasos a L-

cisteína (150 min após o SNAP e na presença constante de L-NAME) observou-se uma diminuição da resposta contrátil adrenérgica, sugerindo provável mobilização de NO intracelular, ou ainda, efeito inespecífico da L-cisteína. É importante salientar que esta redução da resposta contrátil à fenilefrina causada pela L-cisteína em vasos controle, é significativamente menor que o vasorelaxamento mediado pela L-cisteína em preparações pré-incubadas com SNAP em todos os intervalos de tempo avaliados, assim, não causando comprometimento dos resultados apresentados anteriormente e atribuídos ao NO. Já as CCR para fenilefrina realizadas após as sucessivas adições de L-cisteínas em vasos pré-incubados com SNAP indicam que a L-cisteína é capaz de reverter o efeito da hiporeatividade vascular mediada pelo NO. Estudos adicionais com L-cisteína e outros tióis livres são necessários para melhor avaliar o potencial destes agentes em mobilizar e/ou depletar os níveis de S-nitrosotióis em sistemas biológicos, bem como o papel destas drogas frente a hiporeatividade vascular *in vitro* e *in vivo*.

Em nossas investigações, o DTNB inibiu o relaxamento associado a L-cisteína em vasos previamente submetidos ao SNAP e GTN. A comparação da inibição do vasorelaxamento pelo DTNB na presença e ausência de endotélio mostra que o efeito do DTNB é mais efetivo em vasos sem endotélio. Outro conjunto de resultados demonstram que o DTT reverte o efeito do DTNB, em bloquear o relaxamento em vasos com e sem endotélio. Estes achados sugerem que: i) o efeito oxidante do DTNB em grupamentos sulfidrilas de tióis de membrana inibe a instalação do vasorelaxamento de longa duração causada por doadores de NO; ii) a modulação redox de grupamentos sulfidrilas inibe a formação de S-nitrosotióis; iii) os principais alvos do DTNB estão possivelmente localizados na musculatura lisa vascular; e iv) o estresse oxidativo do DTNB não apresenta perfil irreversível e dano celular permanente, tendo em vista o efeito do DTT, um agente redutor e regenerador de grupos sulfidrilas extracelulares. Além disso, dados do presente estudo indicam ainda que alvos extracelulares do DTNB, também são importantes sítios de ligação para NO, no desenvolvimento da vasodilatação e da hiporeatividade. A localização celular específica destes tióis S-nitrosilados que servem como

liberadores de NO tem sido investigada em artérias. Estudos em que foram utilizadas técnicas com imunoligantes, a ligação específica entre o NO e os resíduos de cisteína foram bloqueados após exposição arterial ao ácido *para*-hidroximercuribenzóico (*p*-HMBA; um reagente de tiol que não atravessa as membranas celulares), sugerindo que a S-nitrosação ocorre no espaço extracelular e, portanto, no lado externo da membrana celular (Alencar et al., 2003a). Tais resultados estão de acordo com estudos realizados por Zoccarato e colaboradores (1999) nos quais demonstraram que a GSH reverte a inibição produzida pelo DTNB, restaurando na exocitose de glutamato em sinaptossomas.

No sistema cardiovascular, vários efeitos fisiológicos do NO estão relacionados com a ativação da guanilato ciclase solúvel (Ignarro, 1991) e formação de GMPc, bem como na atuação deste segundo mensageiro em diferentes alvos celulares (Lucas et al., 2000). Dados da literatura revelam também que os efeitos dos S-nitrosotióis são acompanhados pelo aumento da concentração celular de GMPc (Lieberman et al., 1991). Em experimentos prévios, Terluk e colaboradores (2000) demonstraram que inibidores da guanilato ciclase solúvel (azul de metileno e ODQ) reverterem a redução da atividade contrátil α -adrenérgica resultante do efeito persistente do NO. Em ratos tratados com LPS, a inibição da produção de GMPc restaura a reatividade vasoconstritora (Paya et al., 1993b). Além do NO, outro(s) mediador(es) produzidos pela prévia exposição do tecido vascular ao LPS, causam ativação da guanilato ciclase solúvel e produção de GMPc e, também contribuem para hiporeatividade vascular (Wu et al., 1994b). Nossas investigações mostram que a oxidação de grupamentos sulfidrilas em proteínas de membrana pelo DTNB não inibe o relaxamento promovido pelo 8-Br-GMPc, indicando que o DTNB não afeta a atividade de canais de K^+ sensíveis ao GMPc. Ademais, os vasos co-incubados com DTNB e SNAP potencializaram o vasorelaxamento para o 8-Br-GMPc, através de mecanismo não elucidado no presente estudo.

O relaxamento vascular associado à exposição do tecido ao LPS e a tióis ocorre pela via dependente (Mülsch et. al., 1991) e independente da

guanilato ciclase solúvel (Muller et al., 1998). Em resultados prévios, a guanilato ciclase solúvel e os canais de K^+ demonstraram ser importantes efetores da prolongada hiporeatividade à fenilefrina produzida pelo NO e, dentre os canais de K^+ , destaca-se a participação dos BK_{Ca} (Terluk et al., 2000). Silva-Santos e Assreuy (1999) mostraram que a hiporeatividade à fenilefrina verificada 24 horas após administração a doadores de NO em ratos, está associada à ativação de canais de K^+ sensíveis ao TEA, um bloqueador não-seletivo. Além disso, as investigações conduzidas com modelo experimental de choque endotoxêmico em ratos têm constatado o expressivo efeito do NO sobre a atividade de canais de K^+ e da guanilato ciclase, na diminuição da reatividade vascular à fenilefrina (Silva-Santos et al., 2002). Outros estudos também têm mostrado que o NO ativa canais de K^+ em condições patológicas, como o choque séptico (Hall et al. 1996; Wu et al., 1998). De maneira similar, o vasorelaxamento induzido por LPS de *Salmonella typhosa* também está associado à alteração da atividade de canais de K^+ (Hall et al., 1996). Com relação aos subtipos de canais de K^+ , outras investigações têm demonstrado que a ativação dos BK_{Ca} e os K_{ATP} , são responsáveis pela hipotensão induzida por endotoxina e a hiporeatividade a agentes vasopressores (Landry e Oliver, 1992; Hall et al., 1996). Segundo Chen e colaboradores (1999), a hiporeatividade à noradrenalina induzida por endotoxina foi revertida com bloqueadores de canais de K^+ (TEA e caribdotoxina) e inibidor da enzima guanilato ciclase (ODQ). Além disto, a exacerbada produção de NO potencializou o vasorelaxamento evocado por cromakalim (um ativador de K_{ATP}). Estudos eletrofisiológicos revelaram que a endotoxemia causa hiperpolarização da membrana pela ativação de canais de K^+ ativados por Ca^{+2} e K_{ATP} . (Chen et al., 2000). Em processos endotoxêmicos, os canais de K^+ participam da disfunção do tônus vasomotor, e a ativação de BK_{Ca} está associada a excessiva produção de NO que contribui para a hiporeatividade a vasoconstritor (Chen et al., 1999). Já o seletivo bloqueio dos BK_{Ca} pela caribdotoxina, reverte parcialmente a hiporeatividade de longa duração à fenilefrina produzida pelo NO (Terluk et al., 2000). Por sua vez, o NO pode ativar os canais de K^+ , como os BK_{Ca} , através de sinalização intracelular

mediada por GMPc e proteínas quinase (Taniguchi et al., 1993, Archer et al., 1994). Ademais, a ativação dos BK_{Ca} pode ocorrer pela direta ligação do NO com os grupos sulfidrilas nesses canais (Bolotina et al., 1994), uma via considerada como independente de GMPc. Desta forma, a S-nitrosilação de canais iônicos podem alterar alostericamente estas proteínas, modificando a condutividade de íons. O estado redox de grupamentos sulfidrilas de resíduos de cisteína tem sido mostrado como um importante mecanismo de controle da atividade de canais iônicos (Liu e Gutterman, 2002). Agentes redutores e oxidantes podem alterar a função de canais iônicos, incluindo os canais de K⁺ (Soto et al., 2002).

Em nosso estudo, o DTNB diminui significativamente o relaxamento determinado pela ativação dos BK_{Ca} com o NS1619 na concentração de 100 µM. Em parte, estes resultados sugerem que a atividade oxidante do DTNB: i) modifica o funcionalidade dos BK_{Ca}; ii) ocorre em resíduos específicos de cisteínas de grupamentos sulfidrilas presentes nos BK_{Ca}; iii) inibe a atividade dos BK_{Ca}, modificando o decurso dos efeitos de longa duração promovidos pelo NO, a saber, a hiporeatividade à fenilefrina e o vasorelaxamento mediado pela L-cisteína; e iv) previne a hiporeatividade e o relaxamento associados ao NO através da redução da formação dos S-nitrosotióis nas membranas celulares provavelmente associados aos BK_{Ca}.

O timerosal tem sido descrito como um agente oxidante de sulfidrila que atua na superfície extracelular e, que não permeia as membranas celulares lipofílicas. O efeito oxidante do timerosal em cisteínas de grupos sulfidrilas induz a formação de pontes de disulfetos entre os grupos de sulfidrilas e, assim, reduz a atividade de canais de Na⁺ (Song et al., 2000). Ensaio eletrofisiológicos, revelaram que o DTNB e o timerosal, reduzem a atividade dos canais de K⁺ sensíveis ao Ca²⁺, que é parcialmente restaurada com o uso de reagentes redutores de sulfidrilas, o DTT e GSH. Em contraste, o agente oxidante solúvel em lipídeo, o 4,4'-ditiodipiridina, demonstrou menor potência em inibir a condutância dos canais de K⁺ sensíveis ao Ca²⁺, sugerindo que específicos grupamentos sulfidrilas envolvidos na modulação da corrente iônica (Cai e Sauve, 1997). Estudos em células de músculo liso de artéria pulmonar

revelaram que o DTNB não afeta a corrente iônica dos Kv, porém, o DTBNP [2,2'-ditio-bis(5-nitropiridina)] reduz significativamente a atividade destes canais, demonstrando a importância da modulação redox de sítios específicos celulares (Park et al., 1997).

Complementando os dados descritos, o reagente de grupo sulfidril, o ácido p-hidroximercurifenilsulfônico, modifica a corrente de K^+ (Caputo et al., 1994). A oxidação de resíduos específicos de cisteína nos K_{ir} (subtipo $K_{ir}2.3$ e $K_{ir}1.1$) influencia na funcionalidade deste canal (Bannister et al., 1999). Tem sido descrito que o NO e outros reagentes de tióis são capazes de modular vários outros canais iônicos e receptores, como os canais de Ca^{2+} do tipo L, K_{ATP} , IK_{Ca} , NMDA (N-metil-D-aspartato) e o receptores rianodínicos (Coetzee et al. 1995; Campbell et al. 1996; Cai e Sauve, 1997; Eager e Dulhunty, 1999; Herin et al., 2001).

Estudos recentes com agentes redox demonstraram que a aplicação local de L-cisteína aumenta a hiperalgesia térmica em animais com dor neuropática através da modulação da corrente de canais de Ca^{2+} do tipo T e, o DTNB atenua a nocicepção, de maneira dose-dependente. Assim, os agentes oxidantes foram apontados como drogas com potencial terapêutico para o tratamento da dor neuropática (Todorovic et al., 2004). E ainda, a prévia exposição de segmentos de membrana celular ao radical hidroxil ($-OH$) e ao DTNB, aumentam a probabilidade de abertura de canais de cátions não-seletivos sensíveis ao Ca^{2+} (Simon et al., 2004). Os níveis de Ca^{2+} citosólico e a sensibilidade de importantes elementos contráteis regulam a sequência de eventos celulares que determina o tônus do músculo liso. No tecido vascular, alguns estímulos determinam os níveis de Ca^{2+} intracelular e sustentam a contração, como a alta concentração de K^+ que induz despolarização e influxo de Ca^{2+} transmembrana e, a ativação de α -adrenoceptores, como a noradrenalina e a fenilefrina (Karaki et al., 1997). De acordo com os estudos abordados, a inibição da hiporeatividade vascular pelo DTNB também pode estar relacionada à modulação do influxo de canais de Ca^{2+} e, o favorecimento de concentrações de Ca^{2+} adequadas no meio intracelular que propiciem a contração vascular.

Além dos receptores endotelinérgicos, o sistema endotelina abrange a endotelina-1, endotelina-2 e a endotelina-3 (ET-1, ET-2 e ET-3, respectivamente), tendo em vista, que a ET-1 é a forma predominante no plasma e no tecido em humanos. Vários tipos celulares produzem a ET-1, incluindo as células endoteliais e as células do músculo liso vascular. A ET-1 possui alta afinidade para os receptores ET_A e ET_B e contribui para a modulação do tônus vascular. É importante ressaltar que, a estimulação dos receptores endotelinérgicos pela ET-1 produz ativação de sinalização intracelular e, a internalização do complexo ativado receptor-ligante causando vasoconstrição por horas (Haynes e Webb, 1998; Wanecek et al., 2000). Como a ET-1 induz prolongada vasoconstrição, o presente trabalho demonstra alguns dados obtidos de experimentos conduzidos em amostras não-pareadas. Tem sido postulado que a endotelina participa da patogênese de várias doenças, incluindo o choque séptico em humano e em diferentes espécies de animais. O envolvimento do sistema endotelina no choque séptico em humanos, foi estabelecido devido a relação entre os altos níveis plasmáticos deste isopeptídeo e a disfunção de órgãos em pacientes sépticos. Ademais, alguns importantes fatores na sepse como a presença de endotoxina, TNF- α , IL-1 e trombina aumentam a liberação de ET-1 (Wanecek et al., 2000). Outrossim, o antagonista seletivo de receptores ET_B, o BQ788, atenuou a hipotensão, hiporeatividade à noradrenalina e a disfunção hepática em ratos pré-tratados com LPS. Por outro lado, o antagonista de receptor de receptores ET_A, o BQ485, não causou os mesmos efeitos fisiológicos (Ruetten e Thiemermann, 1996b). Os mesmos autores em colaboração com Vane (1996c), demonstram que o antagonista não-seletivo de receptores ET_A e ET_B agravou as alterações do sistema circulatório, hepático e renal e, reduziu a sobrevivência de animais tratados com LPS, comprovando a influência do sistema endotelina na endotoxemia. Já na artéria mesentérica de suínos neonatos, a incubação *in vitro* durante 20 horas com *Streptococcus* (grupo B), causou redução da resposta vasopressora para ET-1 (0,01 a 3 nM), U46619 (0,1 nM a 1 μ M) e noradrenalina (10 nM a 100 μ M), a qual foi revertida com L-NAME (Villamor et al., 1996). Estes dados sugerem a participação do NO na ação da ET-1 e de

outros vasoconstritores. Outros estudos também avaliam as propriedades vasoconstritoras da ET-1 em anéis de aorta utilizando altas concentrações deste peptídeo (10 μ M) (Dieye et al., 1999). Os resultados do presente trabalho mostram que o SNAP (200 μ M) promoveu vasorelaxamento para L-cisteína, o qual foi efetivamente prevenido através da exposição vascular ao DTNB, demonstrando que a ação destes compostos estendem-se as respostas contráteis não-adrenérgicas. Em contraste, a redução da resposta α -adrenérgica verificada com SNAP, a hiporeatividade à ET-1 não foi observada 60 min após este doador de NO. Conforme citado na seção de Resultados, este estudo não incluiu investigações com concentrações maiores de SNAP e modelos de endotoxemia.

Estudos têm revelado que a propriedade oxidante de tióis da diamida em tecido arterial, reduz o relaxamento induzido pela acetilcolina e NO (Adachi e Cohen, 2000). Com base nestas considerações, a possível influência do DTNB sobre o vasorelaxamento também foi investigada. No entanto, em virtude a ausência da modificação da resposta vasodilatadora para acetilcolina, neste estudo, decarta-se a hipótese que o bloqueio da hiporeatividade e do relaxamento pelo DTNB estão relacionados com a alteração dos mecanismos envolvidos no processo fisiológico de vasodilatação.

Segundo a literatura, a reação do DTNB com tióis forma dissulfeto e o ânion tiolato (ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico; TNB) que produz uma coloração amarela, a qual é mensurada através de espectrofotometria (412 nm). Este método de determinação de grupamentos sulfidrilas em tecido recebeu a denominação de ensaio de Ellman e, o DTNB de reagente de Ellman (Ellman, 1959). Além disso, a oxidação de grupamentos sulfidrilas ocasionada pelo próprio NO, reduz a quantidade de tióis livres após a S-nitrosilação, assim, nesta condição química o ensaio de Ellman também tem sido empregado. Todavia, sugere-se que por mecanismo não definido o NO reage com o TNB, resultando na formação de S-nitrosotiol instável, acarretando o comprometimento dos resultados mensurados pelo ensaio de Ellman, na presença de NO (Gergel e Cederbaum, 1997). Assim, o presente estudo avaliou a propriedade química do DTNB/TNB em decompor os S-nitrosotióis

ligados às proteínas de membranas, tendo em vista que o DTNB não atravessa as membranas celulares e que os experimentos foram efetuados em segmentos íntegros de tecido vascular. Em vasos pré-incubados com SNAP, a ausência de relaxamento, após a adição de crescentes concentrações de DTNB, exclui o efeito de quebra da ligação S-NO em S-nitrosotióis por este agente oxidante.

Estudos realizados por Silva-Santos, Terluk e Assreuy (2000), constataram que, as reduções dos níveis pressóricos para fenilefrina verificada na oitava e vigésima-quarta hora após o LPS, foram revertidas na vigésima-quarta hora com inibidor da guanilato ciclase, e na oitava e vigésima-quarta hora com bloqueador não-seletivo de canais de K^+ . Já o pré-tratamento com inibidores da NOS previne a hiporeatividade, em ambos os tempos avaliados, no entanto, o pós-tratamento com estes compostos reverte os valores pressóricos na oitava hora após o LPS. Além disso, dados similares foram obtidos *in vitro* em anéis de aorta expostos ao LPS (10 μ g/ml; durante 12 hora). Outros ensaios também mostram que a expressão da iNOS foi maior na oitava, quando comparada a vigésima-quarta hora após a endotoxina. Assim, no decurso temporal da manutenção da hiporeatividade à fenilefrina associado ao LPS depende do NO produzido pela iNOS (na fase inicial da endotoxemia) e, do NO possivelmente liberado pelos S-nitrosotióis (na fase tardia da endotoxemia) e, ainda, que em ambas as fases ocorre a ativação de canais de K^+ . Sabe-se também que o LPS causa aumento da expressão de canais de K^+ no tecido vascular (Sorrentino et al., 1999) e esquelético (Czaika et al., 2000). Em diferentes bactérias gram-negativas, a composição estrutural conservada no LPS compreende no lipídeo A, na cadeia polissacarídeo *O-antigen* e no centro oligossacarídeo. Outros estudos elucidaram que, o lipídeo A exerce um importante papel na endotoxicidade, promovida pelo LPS (Erridge et al., 2002). Contudo, entre os vários e complexos mecanismos de transdução de sinalização celular estimulados pelo LPS, destaca-se também a ativação dos BK_{Ca} (Seydel et al., 2001). O conjunto destes dados permite ressaltar a importância do estudo de drogas que afetem a atividade de canais de K^+ na hiporeatividade vascular.

Similarmente aos nossos experimentos com doadores de NO apresentados anteriormente, no presente estudo observou-se intensa hiporeatividade à fenilefrina, na oitava hora após a exposição de vasos com endotélio ao LPS (10 µg/ml) e, a adição de DTNB reverteu a vasoplegia existente, de maneira independente da dose utilizada.

Os resultados obtidos no modelo de LPS *in vitro* e *ex vivo* confirmam que, o DTNB pode ser uma nova estratégia de tratamento na clínica, em casos de infecção microbiana. Todavia, vários estudos pré-clínicos complementares são imprescindíveis de serem desenvolvidos, incluindo ensaios toxicológicos (agudos e crônicos em diferentes espécies de animais), bem como, o estudo de compostos análogos e, outros agentes oxidantes com perfil de mecanismo de ação semelhante ao DTNB.

É interessante ressaltar que, nos experimentos *ex vivo*, o DTNB foi eficiente em reverter a hiporeatividade à fenilefrina em vasos de animais tratados com diferentes concentrações de LPS. Além disso, o co-tratamento de animais com LPS e DTNB, 4 e 6 horas após endotoxina, também aboliu totalmente a hiporeatividade ao agonista em estudo, em vasos sem endotélio.

Baseado nas considerações que, a expressão da iNOS é detectada a partir da quarta hora após o estímulo com LPS (Xie et al., 1992), no protocolo do modelo endotoxêmico *ex vivo* do presente estudo, optou-se pela administração de DTNB em uma fase posterior a indução da iNOS. No entanto, é possível considerar que, a interferência redox celular através do DTNB cause certa influência na expressão da iNOS, na fase inicial ou tardia da sepse. Em cultura de macrófagos (J774.2) exposta ao LPS, o bloqueio dos canais de K^+ , K_{ATP} , reduziu significativamente a expressão de iNOS e a formação de NO_2^- (Wu et al., 1995a). Outros estudos descrevem que os biomarcadores de NO, o NO_2^- e o NO_3^- , encontram-se em elevadas concentrações plasmáticas em pacientes com sepse e choque séptico (124 µM *versus* 36 µM para o grupo controle; Evans et al., 1993). Todavia, em nosso estudo, a administração do DTNB, na quarta e na sexta hora após o LPS, não modificou significativamente a quantidade de NO_2^- , na oitava hora após a endotoxina, medido através da reação de Griess (dados não mostrados).

Outro achado importante do presente trabalho refere-se ao fato que a administração do DTNB previne e reverte a hiporeatividade à fenilefrina induzida pelo SNAP *in vivo*, demonstrando que o efeito do DTNB diante da atividade do NO em artéria de condutância, estende-se também a condição sistêmica.

Com relação aos experimentos de mortalidade em camundongos inseridos no presente trabalho, a maior parte dos animais que receberam *E. coli* viável pela via i.p. manifestaram um conjunto de sinais característicos do choque endotóxico, incluindo a letargia, piloereção e taquipnéia. Em estudos utilizando o modelo de CLP em camundongos também foram observados os referidos sinais e, obtidos como indicativo de sepse e choque séptico (Benjamin et al., 2000). Na presente investigação, a administração de 1×10^9 unidades/animal de *E. coli* causou redução da razão de sobrevida dos animais para 60%, essencialmente, 24 e 48 horas após o tratamento com a bactéria. Além disso, observa-se também que o DTNB, administrado 30 min antes da injeção de *E. coli* ou, a cada 12 horas após a bactéria, preveniu a mortalidade dos animais em 20 e 30%, respectivamente. Em parte, estes dados sugerem que: i) a administração periódica de DTNB apresenta maior eficácia em prevenir a mortalidade dos animais sépticos; ii) a inibição da hiporeatividade vascular induzida pelo DTNB aumenta a sobrevida de camundongos endotoxêmicos; ii) o DTNB demonstra ser efetivo na profilaxia e no tratamento da sepse; e iii) diante da complexidade da interação dos inúmeros mediadores e espécies químicas que participam da sepse, faz-se necessário realizar experimentos complementares em associação a agentes antimicrobianos e antiinflamatórios esteroidais utilizados na clínica, para melhor avaliar os efeitos do DTNB frente à severidade desta patologia.

Vários estudos têm constatado redução da mortalidade de animais endotoxêmicos por gram-negativo (bactéria íntegra ou LPS), com lisofosfatidilcolina (Yan et al., 2004); inibidor de caspase 1 (Joshi et al., 2002); agente antimicrobiano, a clindamicina (Hirata et al., 2001); anticorpos contra citocinas, por exemplo anti-IL-12 (Zisman et al., 1997); quelante de ferro e seqüentrador de radicais livres e NO, o ácido dietilenetriamina pentaacético

(DTPA Fe^{3+}) (Molina et al., 1996); inibidor de fosfolipase A_2 , o SB 203347 (Marshall et al., 1995); anticorpo monoclonal para lipídeo A de LPS (Fu et al. 1995); análogos de vitamina D_3 através da regulação de tromboxano A_2 e radicais livres (Horiuchi et al., 1991); seqüentrador de radicais livres, o 2-octadecil ácido ascórbico (Nonaka et al., 1990) e antagonistas de Ca^{2+} , a nifedipina e verapamil associado a antibióticos (gentamicin e cefoxitin) (Bosson et al., 1986). Em contraste aos resultados apresentados, dados da literatura indicam o uso de antioxidantes como estratégia terapêutica, no intuito de aumentar a sobrevivência de pacientes com sepse (Nonaka et al., 1990).

Parte do presente trabalho, abrange a análise dos mecanismos envolvidos no vasorelaxamento de longa duração mediado pela L-cisteína, em anéis de aorta expostos ao NO. Em síntese, o relaxamento para L-cisteína em vasos com e sem endotélio pré-incubados com o SNAP depende da ativação da guanilato ciclase solúvel e da abertura de subtipos de canais de K^+ , sensíveis a alta concentração de K^+ no meio extracelular, os quais são insensíveis ao TEA, 4-aminopiridina, glibenclamina, clotrimazol e caribdotoxina.

Tendo em vista que o ODQ inibe um dos principais alvos do NO, a enzima guanilato ciclase solúvel (Garthwaite et al., 1995), o bloqueio do relaxamento para L-cisteína após o SNAP com o ODQ, confirma os resultados apresentados anteriormente e atribuídos ao NO. Liu e colaboradores (1995) demonstraram que a presença de grupamentos sulfidrilas é essencial para a ativação da guanilato de ciclase pelo NO, em músculo liso vascular. Neste estudo, os autores obtiveram estes resultados utilizando o agente modulador de sulfidrilas, a N-etilmaleimida. Assim, os resultados de vasorelaxamento envolvendo a contínua ativação da guanilato ciclase, provavelmente estão relacionados a grupamentos sulfidrilas de membrana. No presente estudo, constata-se também que o vasorelaxamento causado pela ativação da guanilato ciclase solúvel e a produção de GMPc , não depende da estimulação da PKG e PKA. Vários estudos mostram que a ativação da guanilato ciclase solúvel, corresponde a um dos principais eventos intracelulares para inicializar o relaxamento. Entretanto, os eventos que ocorrem após a formação de GMPc tem sido amplamente discutidos (Lincoln et al., 2001, Ruth, 1999).

O tônus vascular fisiológico é influenciado pela atividade da bomba eletrogênica Na^+/K^+ e, em condições endotoxêmicas, ocorre a ativação desta bomba, por uma via dependente de GMPc (Chen et al., 2003b), assim, tais constatações sugerem a realização de novos experimentos neste sentido.

Outros estudos têm sugerido que os estoques de NO na parede vascular encontram-se em compartimentos celulares hidrofílicos e hidrofóbicos, formados por proteínas ligadas ao complexo ferro dinitrosil (DNIC; *protein-bound dinitrosyl-non-heme iron complexes*), além dos S-nitrosotióis (Vlasova et al., 2003). Os DNIC de baixo peso molecular atuam como doadores de NO, promovendo o vasorelaxamento (Mülsch et al., 1991). Além disso, a adição de tióis de baixo peso molecular acelera a decomposição de S-nitrosotióis (Scharfstein et al., 1994, Alencar et al., 2003a) e de DNIC, demonstrado através do efeito de vasorelaxamento (Muller et al., 1996) por via dependente (Mülsch et al., 1991) e independente da guanilato ciclase solúvel (Muller et al., 1998). De fato, o vasorelaxamento e a inibição do tônus arterial produzidos pelo NO, abordados no presente trabalho, pode também estar associados a formação de DNIC.

Em conjunto com os resultados prévios, a análise das respostas vasculares mediadas pelo NO, de hiporeatividade à fenilefrina (Terluk et al., 2000) e de vasorelaxamento induzido por L-cisteína apresentam algumas similaridades, pois ambos são: i) eventos de longa duração induzidos pelo NO; ii) mediados pela ativação da guanilato ciclase solúvel; iii) decorrentes da ativação de canais de K^+ ; iv) modulados pela presença e ausência de endotélio; v) inibidos pelo DTNB; e iv) possivelmente dependentes da S-nitrosação de grupamentos sulfidrilas de resíduos de cisteínas em proteínas das membrana celular.

1Os avanços científicos em busca do melhor entendimento dos mecanismos biológicos, essenciais para estabelecimento e manutenção da hiporeatividade a vasoconstritores e a vasodilatação a tióis mediado pelo NO, e a exata compreensão do papel dos resíduos de cisteínas e, dos grupamentos sulfidrilas em proteínas intracelulares e transmembranas, podem contribuir para desenvolvimento de novos fármacos, ou ainda, a aplicação de drogas

atualmente utilizadas para outras finalidades, para o efetivo tratamento da sepse, sepse severa e do choque séptico.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo mostram que:

- A prévia exposição de anéis de aorta aos doadores de NO, SNAP e GTN, reduzem de forma persistente a resposta contrátil à fenilefrina. Em vasos com e sem endotélio, a intensidade da hiporeatividade à fenilefrina foi dependente da concentração de SNAP.
- A remoção da camada endotelial potencializa a hiporeatividade à fenilefrina produzida pelo NO, caracterizando um efeito protetor do endotélio, que não está associado à produção de O_2^- , angiotensina II, endotelina (via receptores ET-A), produtos derivados das enzimas COX, lipooxygenase, citocromo P-450 e eNOS;
- A atividade oxidante do DTNB previne e reverte a hiporeatividade à fenilefrina de longa duração mediada pelo SNAP e, na ausência do endotélio, o DTNB demonstrou maior eficácia em prevenir o efeito do NO. Isto evidencia a participação de grupamentos sulfidrilas de proteínas de membranas celulares principalmente na musculatura lisa vascular.
- Em vasos com endotélio, a prevenção da hiporeatividade tecidual causada pelo SNAP também ocorre com outro agente oxidante, a diamida em vasos com endotélio, mas não com agente redutor, o DTT em anéis sem endotélio.
- A adição de tióis de baixo peso molecular, tais como a L-cisteína e a N-acetilcisteína, promoveu marcante relaxamento de longa duração em vasos pré-incubados com SNAP, sugerindo que a hiporeatividade e o vasorelaxamento são eventos relacionados a S-nitrosação de resíduos de cisteína e a mobilização de NO.
- Seguidas adições de L-cisteína à vasos pré-incubados com SNAP, reverteram a redução da resposta contrátil à fenilefrina.
- O efeito oxidante do DTNB impede o relaxamento promovido pela ativação de BK_{Ca} pelo NS1619, sugerindo que o bloqueio da dos eventos vasculares causados pelo NO, hiporeatividade e

relaxamento, em parte, ocorrem via BK_{Ca} . Além disso, o DTNB não altera o vasorelaxamento causado pelo 8-Br-GMPc e a acetilcolina, e ainda, não promove relaxamento em vasos pré-incubados com SNAP.

- Em vasos pré-contraídos com ET-1, o relaxamento para L-cisteína associado ao SNAP foi prevenido através da exposição vascular ao DTNB. Em contraste, a concentração de 200 μ M de SNAP não foi eficaz de causar hiporeatividade endotelinérgica.
- Em experimentos *ex vivo*, o DTNB foi eficiente em reverter a hiporeatividade à fenilefrina em vasos de animais tratados com LPS. Além disso, o co-tratamento de animais com LPS e DTNB, 4 e 6 horas após endotoxina, também aboliu totalmente a hiporeatividade à fenilefrina, em vasos sem endotélio.
- O DTNB previne e reverte a hiporeatividade à fenilefrina induzida pelo SNAP *in vivo*.
- A administração de *E. coli* causou mortalidade da ordem de 60%, e o DTNB administrado 30 min antes da *E. coli* ou a cada 12 horas após a administração da bactéria, reduziu a mortalidade em 20 e 30 %, respectivamente.
- O vasorelaxamento mediado pela L-cisteína, em anéis de aorta pré-incubados com o SNAP, depende da ativação da guanilato ciclase solúvel e da abertura de subtipos de canais de K^+ , sensíveis a alta concentração de K^+ no meio extracelular, mas insensíveis ao TEA, 4-aminopiridina, glibenclamina, clotrimazol e caribdotoxina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, T; COHEN, RA. Decreased aortic glutathione levels may contribute to impaired nitric oxide-induced relaxation in hypercholesterolaemia. **Br. J. Pharmacol.**, 129, 1014-1020, 2000.
- ALDERTON, WK; COOPER, CE; KNOWLES, RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, 357, 593-615, 2001.
- ALENCAR, JL; LOBYSHEVA, I; GEFFARD, M; SARR, M; SCHOTT, C; SCHINI-KERTH, VB; NEPVEU, F; STOCLET, JC; MULLER, B. Role of S-nitrosation of cysteine residues in long-lasting inhibitory effect of nitric oxide on arterial tone. **Mol. Pharmacol.**, 63, 1148-1158, 2003a.
- ALENCAR, JL; LOBYSHEVA, I; CHALUPSKY, K; GEFFARD, M; NEPVEU, F; STOCLET, JC; MULLER, B. S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 307, 152-159, 2003b.
- AL-SA'DONI, H; FERRO, A. S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. **Clin. Sci. (Lond.)**, 98, 507-520, 2000.
- ANDERSON, JL; WILLIAMS, G; HEAD, SI. The role of nitric oxide in diaphragmatic dysfunction in endotoxemic rats. **Muscle & Nerve**, 24, 30-36, 2001.
- ANDRIANTSITOHAINA, R; LAGAUD, GJ; ANDRE, A; MULLER, B; STOCLET, JC. Effects of GMPc on calcium handling in ATP-stimulated rat resistance arteries. **Am. J. Physiol.**, 268, H1223- H1231, 1995.
- ANEL, RL; KUMAR, A. Experimental and emerging therapies for sepsis and septic shock. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, 10, 1471-1485, 2001.
- ARCHER, SL; HUANG, JM; HAMPL, V; NELSON, DP; SHULTZ, PJ; WEIR, EK. Nitric oxide and GMPc cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K^+ channel by GMPc-dependent protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 91, 7583-7587, 1994.
- ARNELLE, DR; STAMLER, JS. NO^+ , NO^\cdot , and NO^- donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. **Arch. Biochem. Biophys.**, 318, 279-285, 1995.
- ARRIETA, O; RODRIGUEZ-REYNA, TS; SOTELO J. Pharmacological treatment of septic shock. **Exp. Opin. Ther. Patents**, 10, 601-622, 2000.
- BANNISTER, JP; YOUNG, BA; MAIN, MJ; SIVAPRASADARAO, A; WRAY, D. The effects of oxidizing and cysteine-reactive reagents on the inward

- rectifier potassium channels Kir2.3 and Kir1.1. *Pflugers Arch.*, 438, 868-878, 1999.
- BEAL, AL; CERRA, FB. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *JAMA.*, 271, 226-33, 1994.
- BEISHUIZEN, A; VERMES, I; HAANEN, C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. *Adv. Clin. Chem.*, 33,55-131, 1998.
- BENJAMIM, CF; FERREIRA, SH; CUNHA, FQ. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J. Infect. Dis.*, 182, 214-223, 2000.
- BERMEJO, A; ZARZUELO, A; DUARTE, J. In vivo vascular effects of genistein on a rat model of septic shock induced by lipopolysaccharide. *Cardiovasc. Pharmacol.* 42, 329-238, 2003.
- BIALECKI, RA; STINSON-FISHER, C. KCa channel antagonists reduce NO donor-mediated relaxation of vascular and tracheal smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 268, L152- L159, 1995.
- BLENDIS, L; WONG, F. The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. *Pharmacol. Ther.*, 89, 221-231, 2001.
- BOFFA, JJ; ARENDSHORST, WJ. Maintenance of Renal Vascular Reactivity Contributes to Acute Renal Failure during Endotoxemic Shock. *Am. Soc. Nephrol.*, 16, 117-124, 2005.
- BOLOTINA, VM; NAJIBI, S; PALACINO, JJ; PAGANO, PJ; COHEN, RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 368, 850-853, 1994.
- BOSSON, S; KUENZIG, M; SCHWARTZ, SI. Increased survival with calcium antagonists in antibiotic-treated bacteremia. *Circ. Shock.*, 19, 69-74, 1986.
- BROILLET, MC. S-nitrosylation of proteins. *Cell Mol. Life Sci.*, 55, 1036-1042, 1999.
- BUGA; GM, GRISCAVAGE, JM; ROGERS, NE; IGNARRO, LJ. Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ. Res.*, 73, 808-812, 1993.
- BUTLER, AR; FLITNEY, FW; WILLIAMS, DL. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol. Sci.*, 16, 18-22, 1995.
- BUTLER, AR; RHODES, P. Chemistry, analysis and biological roles of S-nitrosothiols. *Anal Biochem.*, 249, 1-9, 1997.

- CAI, S; SAUVE, R. Effects of thiol-modifying agents on a K(Ca²⁺) channel of intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells. **J. Membr. Biol.**, 158, 147-158, 1997.
- CAMPBELL, DL; STAMLER, JS; STRAUSS, HC, Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. **The Journal of General Physiology**, 108, 277-293, 1996.
- CAPUTO C, PEROZO E, BEZANILLA F. Chemical modification of squid axon K⁺ channel -SH groups with the organic mercurial compound p-hydroxymercuriphenylsulfonic acid (PHMPS). **Pflugers Arch.**, 428, 315-322, 1994.
- CHAUHAN, SD; SEGGARA, G; VO, PA; MACALLISTER, RJ; HOBBS, AJ; AHLUWALIA, A. Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. **FASEB J.**, 17, 773-775, 2003.
- CHERRY, PD; FURCHGOTT, RF; ZAWADZKI, JV; JOTHIANANDAN, D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 79, 2106-2110, 1982.
- CHEN, SJ; WU, CC; YEN, MH. Alterations of ex vivo vascular reactivity in intraperitoneal sepsis. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 24, 786-793, 1994.
- CHEN, SJ; WU, CC; YEN, MH. Role of nitric oxide and K⁺-channels in vascular hyporeactivity induced by endotoxin. **Naunyn Schm. Arch. Pharmacol.**, 359, 493-499, 1999.
- CHEN, SJ; WU, CC; YANG, SN; LIN, CI; YEN, MH. Hyperpolarization contributes to vascular hyporeactivity in rats with lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. **Life Sci.**, 68, 659-668, 2000.
- CHEN, Z; ZHANG, J; STAMLER, JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 99, 8306-8311, 2002.
- CHEN, K; THOMAS, SR; KEANEY, JF JR. Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. **Free Radic. Biol. Med.**, 35, 117-132, 2003a.
- CHEN, SJ; CHEN, KH; WEBB, RC; YEN, MH; WU, CC. Abnormal activation of Na⁺-K⁺ pump in aortas from rats with endotoxaemia. **Naunyn Schm. Arch. Pharmacol.**, 368, 57-62, 2003b.
- CKLESS, K; REYNAERT, NL; TAATJES, DJ; LOUNSBURY, KM; VAN DER VLIET, A; JANSSEN-HEININGER, Y. In situ detection and visualization of S-nitrosylated proteins following chemical derivatization: identification of

- Ran GTPase as a target for S-nitrosylation. **Nitric Oxide.**, 11, 216-227, 2004.
- COETZEE, WA; NAKAMURA, TY; FAIVRE, JF. Effects of thiol-modifying agents on KATP channels in guinea pig ventricular cells. **Am. J. Physiol.**, 269, H1625- H1633, 1995.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, 420, 885-891, 2002.
- CORDA, S; MEBAZAA, A; TAVERNIER, B; AYED, MB; PAYEN, D. Paracrine regulation of cardiac myocytes in normal and septic heart. **J. Crit. Care.**, 13, 39-47, 1998.
- CUZZOCREA, S; MAZZON, E; COSTANTINO, G; SERRAINO, I; DUGO, L; CALABRO, G; CUCINOTTA, G; DE SARRO, A; CAPUTI, AP. Beneficial effects of n-acetylcysteine on ischaemic brain injury. **Br. J. Pharmacol.** 130, 1219-1226, 2000.
- CZAIKA, G; GINGRAS, Y; ZHU, E; COMTOIS AS. Induction of the ATP-sensitive potassium (uK(ATP)-1) channel by endotoxemia. **Muscle Nerve.**, 23, 967-999, 2000.
- DAWSON, VL; DAWSON, TM. Nitric oxide in neurodegeneration. **Prog. Brain Res.**, 118, 215-229, 1998.
- DE BERRAZUETA, JR. The Nobel Prize for nitric oxide. The unjust exclusion of Dr. Salvador Moncada. **Rev. Esp. Cardiol.**, 52, 221-226, 1999.
- D'EMMANUELE DI VILLA BIANCA, R; LIPPOLIS, L; AUTORE, G; POPOLO, A; MARZOCCO, S; SORRENTINO, L; PINTO, A; SORRENTINO, R. Dexamethasone improves vascular hyporeactivity induced by LPS in vivo by modulating ATP-sensitive potassium channels activity. **Br. J. Pharmacol.**, 140, 91-96, 2003.
- DIACONU, C; BURCOVEANU, C; DOGARU, C; STOICA, S. Nonocclusive intestinal ischemia. **Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.**, 99, 227-230, 1995.
- DICHIARA, TJ; REINHART, PH. Redox modulation of hslc Ca²⁺-activated K⁺ channels. **J. Neurosci.**, 17, 4942-4955, 1997.
- DIEYE, AM; VAN OVERLOOP, B; GAIRARD, A. Endothelin-1 and relaxation of the rat aorta during pregnancy in nitroarginine-induced hypertension. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 13, 204-212, 1999.
- DURANTE, W. Regulation of L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells. **Cell Biochem. Biophys.**, 35, 19-34, 2001.

- EAGER, KR; DULHUNTY, AF. Cardiac ryanodine receptor activity is altered by oxidizing reagents in either the luminal or cytoplasmic solution. **J. Membr. Biol.**, 167, 205-214, 1999.
- EJIMA, K; LAYNE, MD; CARVAJAL, IM; KRITEK, PA; BARON, RM; CHEN, YH; VOM SAAL, J; LEVY, BD; YET, SF; PERRELLA MA. Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to endotoxin-induced inflammation and death. **FASEB J.**, 17, 1325-1327, 2003.
- ELLMAN, GL. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.**, 82, 70, 1959.
- ERRIDGE, C; BENNETT-GUERRERO, E; POXTON IR. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microbes and Infection**, 837-851, 2002.
- ESPEY, MG; MIRANDA, KM; FEELISCH, M; FUKUTO, J; GRISHAM, MB; VITEK, MP; WINK, DA. Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 899, 209-221, 2000.
- ESPEY, MG; MIRANDA, KM; THOMAS, DD; XAVIER, AS; CITRIN, D; VITEK, MP; WINK, DA. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 962, 195-206, 2002.
- EVANS, T; CARPENTER, A; KINDERMAN, H; COHEN, J. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. **Circ. Shock.**, 41, 77-81, 1993.
- EVGENOV, OV; EVGENOV, NV; MOLLNES, TE; BJERTNAES, LJ. Methylene blue reduces pulmonary oedema and cyclo-oxygenase products in endotoxaemic sheep. **Eur. Respir. J.**, 20, 957-964, 2002.
- FATEHI-HASSANABAD, Z; MULLER, B; ANDRIANTSITOHAINA, R; FURMAN, BL; PARRATT, JR; STOCLET, JC. Influence of indomethacin on the haemodynamic effects of lipopolysaccharide in rats. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 10, 258-263, 1996.
- FAYERS, KE; CUMMINGS, MH; SHAW, KM; LAIGHT, DW. Nitrate tolerance and the links with endothelial dysfunction and oxidative stress. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 56, 620-628, 2003.
- FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naynyn Schm. Arch. Pharmacol.**, 358, 113-122, 1998.
- FEIHL, F; WAEBER, B; LIAUDET, L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? **Pharmacol. Ther.**, 91, 179-213, 2001.

- FIELD, L; DILTS, RV; RAVICHANDRAN, R; LENHERT, PG; CARNAHAN, GE. An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine; X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite. **J. Chem. Soc. Comm.**, 249-250, 1978.
- FILIPÉANU, CM; BRAILOIU, E; PETRESCU, G; NELEMANS, SA. Extracellular and intracellular arachidonic acid-induced contractions in rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, 349, 67-73, 1998.
- FLEMING, I; JULOU-SCHAEFFER, G; GRAY, GA; PARRATT, JR; STOCLET, JC. Evidence that an L-arginine/nitric oxide dependent elevation of tissue cyclic GMP content is involved in depression of vascular reactivity by endotoxin. **Br. J. Pharmacol.**, 103, 1047-1052, 1991.
- FLEMING, I; GRAY, GA; STOCLET, JC. Influence of endothelium on induction of the L-arginine-nitric oxide pathway in rat aortas. **Am. J. Physiol.**, 264, H1200- H1207, 1993.
- FÖRSTERMANN, U; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. **Naynyn Schm. Arch. Pharmacol.**, 352, 351-364, 1995.
- FOSTER, MW; MCMAHON, TJ; STAMLER, JS. S-nitrosylation in health and disease. **Trends Mol. Med.**, 9, 160-168, 2003.
- FRIEBE, A; KOESLING, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Circ. Res.**, 93, 96-105, 2003.
- FU, W; XIAO, G; YU, P. Establishment of hybridoma lines and protective study of monoclonal antibodies against lipid A of endotoxins. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi.**, 75, 159-160, 190-1, 1995.
- FURCHGOTT, RF; ZAWADZKI, JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288, 373-376, 1980.
- GACHOT, B; BEDOS, JP; VEBER, B; WOLFF, M; REGNIER, B. Short-term effects of methylene blue on hemodynamics and gas exchange in humans with septic shock. **Intensive Care Med.**, 21, 1027-1031, 1995.
- GALLEY, HF; HOWDLE, PD; WALKER, BE; WEBSTER, NR. The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. **Free Radic. Biol. Med.**, 23, 768-774, 1997.
- GARTHWAITE, J; SOUTHAM, E; BOULTON, CL; NIELSEN, EB; SCHMIDT, K; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl

- cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol.**, 48, 184-188, 1995.
- GASTON, B; REILLY, J; DRAZEN, JM; FACKLER, J; RAMDEV, P; ARNELLE, D; MULLINS, ME; SUGARBAKER, DJ; CHEE, C; SINGEL, DJ; et al. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 90, 10957-10961, 1993.
- GASTON, B. Nitric oxide and thiol groups. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1411, 323-333, 1999.
- GERGEL', D; CEDERBAUM, AI. Interaction of nitric oxide with 2-thio-5-nitrobenzoic acid: implications for the determination of free sulfhydryl groups by Ellman's reagent. **Arch. Biochem. Biophys.**, 347, 282-288, 1997.
- GIBRAEIL, HD; DITTRICH, P; SALEH, S; MAYER, B. Inhibition of endotoxin-induced vascular hyporeactivity by 4-amino-tetrahydrobiopterin. **Br. J. Pharmacol.**, 131, 1757-1765, 2000.
- GOW, AJ; ISCHIROPOULOS, H. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. **J. Cell Physiol.**, 187, 277-28, 2001.
- GOW, AJ; CHEN, Q; HESS, DT; DAY, BJ; ISCHIROPOULOS, H; STAMLER, JS. Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. **J. Biol. Chem.**, 277, 9637-9040, 2002.
- GRATTON, JP; MAURICE, MC; RAE, GA; D'ORLEANS-JUSTE, P. Pharmacological properties of endothelins and big endothelins in ketamine/xylazine or urethane anesthetized rats. **Am. J. Hypertens.**, 8, 1121-1127, 1995.
- GRIFFITH, OW; STUEHR, DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. **Annu. Rev. Physiol.**, 57, 707-736, 1995.
- GRYGLEWSKI, RJ; PALMER, RM; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, 320, 454-456, 1986.
- HAJ-YEHIA, AI; BENET, LZ. In vivo depletion of free thiols does not account for nitroglycerin-induced tolerance: a thiol-nitrate interaction hypothesis as an alternative explanation for nitroglycerin activity and tolerance. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 278, 1296-1305, 1996.
- HALL, S; TURCATO, S; CLAPP, L. Abnormal activation of K⁺ channels underlies relaxation to bacterial lipopolysaccharide in rat aorta. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 224, 184-190, 1996.

- HAMILTON, CA; BERG, G; MCINTYRE, M; MCPHADEN, AR; REID, JL; DOMINICZAK, AF. Effects of nitric oxide and superoxide on relaxation in human artery and vein. **Atherosclerosis**, 133, 77-86, 1997.
- HANSPAL, IS; MAGID, KS; WEBB, DJ; MEGSON, IL. The effect of oxidative stress on endothelium-dependent and nitric oxide donor-induced relaxation: implications for nitrate tolerance. **Nitric Oxide**, 6, 263-270, 2002.
- HAYNES, WG; WEBB, DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. **J. Hypertens.**, 16, 1081-1098, 1998.
- HECKER, M; CATTARUZZA, M; WAGNER, AH. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. **Gen. Pharmacol.**, 32, 9-16, 1999.
- HERIN, GA; DU, S; AIZENMAN, E. The neuroprotective agent ebselen modifies NMDA receptor function via the redox modulatory site. **J. Neurochem.**, 78, 1307-1314, 2001.
- HEYMAN, SN; DARMON, D; GOLDFARB, M; BITZ, H; SHINA, A; ROSEN, S; BREZIS, M. Endotoxin-induced renal failure. I. A role for altered renal microcirculation. **Exp. Nephrol.**, 8, 266-274, 2000.
- HIBBS, JB JR; TAINTOR, RR; VAVRIN, Z; RACHLIN, EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochim. Biophys. Res. Commun.**, 157, 87-94, 1988.
- HINSHAW, LB. Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. **Crit. Care Med.** 24, 1072-1078, 1996.
- HIRATA, N; HIRAMATSU, K; KISHI, K; YAMASAKI, T; ICHIMIYA, T; NASU, M. Pretreatment of mice with clindamycin improves survival of endotoxic shock by modulating the release of inflammatory cytokines. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 45, 2638-2642, 2001.
- HO, KH; KWAN, CY; BOURREAU, JP. Hyporesponsiveness to Ca^{2+} of aortic smooth muscle in endotoxin-treated rats: no-dependent and -independent in vitro mechanisms. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.**, 92, 275-284, 1996.
- HOFFMANN, J; HAENDELER, J; ZEIHNER, AM; DIMMELER, S. TNF α and oxLDL reduce protein S-nitrosylation in endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, 276, 41383-41387, 2001.
- HOGG, N. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. **Free Radic. Biol. Med.**, 28, 1478-1486, 2000.

- HORIUCHI, H; NAGATA, I; KOMORIYA, K. Protective effect of vitamin D3 analogues on endotoxin shock in mice. **Agents Actions.**, 33, 343-348, 1991.
- ICHINOSE, F; HATAISHI, R; WU, JC; KAWAI, N; RODRIGUES, AC; MALLARI, C; POST, JM; PARKINSON, JF; PICARD, MH; BLOCH, KD; ZAPOL, WM. A selective inducible NOS dimerization inhibitor prevents systemic, cardiac, and pulmonary hemodynamic dysfunction in endotoxemic mice. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, 285, H2524- H2530, 2003.
- IGNARRO, LJ; BUGA, GM; BYRNS, RE; WOOD, KS; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 246, 218-226, 1988.
- IGNARRO, LJ. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochem. Pharmacol.**, 41, 485-490, 1991.
- IGNARRO, LJ; NAPOLI, C; LOSCALZO, J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. **Circ Res.**, 90, 21-28, 2002.
- ISHIBASHI T, KAWADA T, KATO K, HAMAGUCHI M, IMAI S. Contribution of activation of K⁺ channels to glyceryl trinitrate-induced relaxation of rabbit aorta. **Gen. Pharmacol.**, 26, 543-552, 1995.
- JAWORSKI, K; KINARD, F; GOLDSTEIN, D; HOLVOET, P; TROUET, A; SCHNEIDER, Y-J; REMACLE, C. S-nitrosothiols do not induce oxidative stress, contrary to other nitric oxide donors, in cultures of vascular endothelial or smooth muscle cells. **Eur. J. Pharmacol.**, 425, 11-19, 2001.
- JOSHI, VD; KALVAKOLANU, DV; HEBEL, JR; HASDAY, JD; CROSS AS. Role of caspase 1 in murine antibacterial host defenses and lethal endotoxemia. **Infect Immun.**, 70, 6896-6903, 2002.
- JULOU-SCHAEFFER, G; GRAY, GA; FLEMING, I; SCHOTT, C; PARRATT, JR; STOCLET, JC. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. **Am. J. Physiol.**, 259, H1038- H1043, 1990.
- KARAKI, H; OZAKI, H; HORI, M; MITSUI-SAITO, M; AMANO, K; HARADA, K; MIYAMOTO, S; NAKAZAWA, H; WON, KJ; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol. Rev.**, 49, 157-230, 1997.
- KEANEY, JF JR; PUYANA, JC; FRANCIS, S; LOSCALZO, JF; STAMLER, JS; LOSCALZO, J. Methylene blue reverses endotoxin-induced hypotension. **Circ. Res.**, 74, 1121-1125, 1994.

- KIM, HW; TAI, J; GREENBURG, AG. Nitric oxide scavenging modulates an experimental vasoplegia in-vitro. **Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.**, 29, 263-274, 2001.
- KIROV, MY; EVGENOV, OV; EVGENOV, NV; EGORINA, EM; SOVERSHAEV, MA; SVEINBJORNSSON, B; NEDASHKOVSKY, EV; BJERTNAES, LJ. Infusion of methylene blue in human septic shock: a pilot, randomized, controlled study. **Crit. Care Med.**, 29, 1860-1867, 2001.
- KLOSTERHALFEN, B; BHARDWAJ, RS. Septic shock. **Gen. Pharmacol.**, 31, 25-32, 1998.
- KRUMENACKER, JS; HANAFY, KA; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. **Brain Res. Bull.**, 62, 505-515, 2004.
- LAL, B; GOLDSTEIN, G; BRESSLER, JP. Role of anion exchange and thiol groups in the regulation of potassium efflux by lead in human erythrocytes. **J. Cell Physiol.**, 167, 222-228, 1996.
- LANDRY, DW; OLIVER, JA. The ATP-sensitive K⁺ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog. **J. Clin. Invest.**, 89, 2071-2074, 1992.
- LEVY, MM; FINK, MP; MARSHALL, JC; ABRAHAM, E; ANGUS, D; COOK, D; COHEN, J; OPAL, SM; VINCENT, JL; RAMSAY, G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Med.**, 29, 530-538, 2003.
- LIEBERMAN, EH; O'NEILL, S; MENDELSON, ME. S-nitrosocysteine inhibition of human platelet secretion is correlated with increases in platelet GMPc levels. **Circ. Res.**, 68, 1722-1728, 1991.
- LINAS, SL; REPINE, JE. Endothelial cells protect vascular smooth muscle cells from H₂O₂ attack. **Am. J. Physiol.**, 272, F767-F773, 1997.
- LINCOLN, TM; DEY, N; SELLAK, H. Invited review: GMPc-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **J. Appl. Physiol.**, 91, 1421-1430, 2001.
- LIU, ZG; MCLAUGHLIN, BE; MARKS, GS; BRIEN, JF; NAKATSU, K. Sulfhydryl involvement in nitric oxide sequestration and nitric oxide induced guanylyl cyclase activation in vascular smooth muscle. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 73, 1144-1148, 1995.
- LIU, Y; GUTTERMAN, DD. Oxidative stress and potassium channel function. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 29, 305-311, 2002.

- LUCAS, KA; PITARI, GM; KAZEROUNIAN, S; RUIZ-STEWART, I; PARK, J; SCHULZ, S; CHEPENIK, KP; WALDMAN, SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol. Rev.**, 52, 375-414, 2000.
- MARLETTA, MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **Biol. Chem.**, 268, 12231-12234, 1993.
- MARSH, CB; WEWERS, MD. The pathogenesis of sepsis. Factors that modulate the response to gram-negative bacterial infection. **Clin. Chest. Med.**, 17, 183-97, 1996.
- MARSHALL, LA; HALL, RH; WINKLER, JD; BADGER, A; BOLOGNESE, B; ROSHAK, A; FLAMBERG, PL; SUNG, CM; CHABOT-FLETCHER, M; ADAMS, JL ET AL. SB 203347, an inhibitor of 14 kDa phospholipase A2, alters human neutrophil arachidonic acid release and metabolism and prolongs survival in murine endotoxin shock. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 274, 1254-1262, 1995.
- MASFERRER JL, SEIBERT K. Regulation of prostaglandin synthesis by glucocorticoids. **Receptor**, 4, 25-30, 1994.
- MATALON, S; HARDIMAN, KM; JAIN, L; EATON, DC; KOTLIKOFF, M; EU, JP; SUN, J; MEISSNER, G; STAMLER, JS. Regulation of ion channel structure and function by reactive oxygen-nitrogen species. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, 285, L1184-L1189, 2003.
- MCINTYRE, M; BOHR, DF; DOMINICZAK, AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. **Hypertension**, 34, 539-545, 1999.
- MEGSON, IL; GREIG, IR; GRAY, GA; WEBB, DJ; BUTLER, AR. Prolonged effect of a novel S-nitrosated glyco-amino acid in endothelium-denuded rat femoral arteries: potential as a slow release nitric oxide donor drug. **Br. J. Pharmacol.**, 122, 1617-1624, 1997.
- MEGSON, IL; MORTON, S; GREIG, IR; MAZZEI, FA; FIELD, RA; BUTLER, AR; CARON, G; GASCO, A; FRUTTERO, R; WEBB, DJ. N-Substituted analogues of S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine: chemical stability and prolonged nitric oxide mediated vasodilatation in isolated rat femoral arteries. **Br. J. Pharmacol.**, 126, 639-648, 1999.
- MITCHELL, JA; AKARASEREENONT, P; THIEMERMANN, C; FLOWER, RJ; VANE, JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 90, 11693-11697, 1993.
- MOLINA, L; STUDENBERG, S; WOLBERG, G; KAZMIERSKI, W; WILSON, J; TADEPALLI, A; CHANG, AC; KOSANKE, S; HINSHAW, L. Efficacy of

- treatment with the iron (III) complex of diethylenetriamine pentaacetic acid in mice and primates inoculated with live lethal dose 100 *Escherichia coli*. **J. Clin. Invest.**, 98, 192-198, 1996.
- MONCADA, S; PALMER, RMJ; HIGGS, AE. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43, 109-142, 1991.
- MOOCHHALA, SM; SIEW-YANG, KL. The role of inducible nitric oxide synthase inhibitor on the arteriolar hyporesponsiveness in hemorrhagic-shocked rats. **Life Sci.**, 73, 1825-1834, 2003.
- MULLER, B; KLESCHYOV, AL; STOCLET, JC. Evidence for N-acetylcysteine-sensitive nitric oxide storage as dinitrosyl-iron complexes in lipopolysaccharide-treated rat aorta. **Br. J. Pharmacol.**, 119, 1281-1285, 1996.
- MULLER, B; KLESCHYOV, AL; MALBLANC, S; STOCLET, JC. Nitric oxide-related cyclic GMP-independent relaxing effect of N-acetylcysteine in lipopolysaccharide-treated rat aorta. **Br. J. Pharmacol.**, 123, 1221-1229, 1998.
- MULLER, B; KLESCHYOV, AL; ALENCAR, JL; VANIN, A; STOCLET, JC. Nitric oxide transport and storage in the cardiovascular system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 962, 131-139, 2002.
- MÜLSCH, A; MORDVINTCEV, P; VANIN, AF; BUSSE, R. The potent vasodilating and guanylyl cyclase activating dinitrosyl-iron(II) complex is stored in a protein-bound form in vascular tissue and is released by thiols. **FEBS Lett.**, 294, 252-256, 1991.
- MÜNDEL, T. Does nitroglycerin. Therapy hit the endothelium ? **J. Am. Col. of Cardiol.**, 38, 1102-1105, 2001.
- NAKAKI, T; OTSUKA, Y; NAKAYAMA, M; KATO, R. Endothelium-accelerated hyporesponsiveness of norepinephrine-elicited contraction of rat aorta in the presence of bacterial lipopolysaccharide. **Eur. J. Pharmacol.**, 219, 311-318, 1992.
- NASU, T; TODA, H; SHIBATA, H. Differential inhibitory mechanism of Fe²⁺ and Fe³⁺ on contraction of ileal longitudinal smooth muscle. **Pharmacol. Res.**, 43, 95-102, 2001.
- NEEDLEMAN P, ISAKSON PC. The discovery and function of COX-2. **J. Rheumatol. Suppl.**, 49, 6-8, 1997.
- NELSON, EJ; CONNOLLY, J; MCARTHUR, P. Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. **Biol Cell.**, 95, 3-8, 2003.

- NONAKA, A; MANABE, T; TOBE, T. Effect of a new synthetic free radical scavenger, 2-octadecyl ascorbic acid, on the mortality in mouse endotoxemia. **Life Sci.**, 47, 1933-1939, 1990.
- PAGLIARO, P. Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. **Life Sci.**, 73, 2137-2149, 2003.
- PALMER, RM; FERRIGE, AG; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327, 524-526, 1987.
- PARK, MK; BAE, YM; LEE, SH; HO, WK; EARM, YE. Modulation of voltage-dependent K⁺ channel by redox potential in pulmonary and ear arterial smooth muscle cells of the rabbit. **Pflugers Arch.**, 434, 764-771, 1997.
- PARRATT, JR. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. **J. Antimicrob. Chemother.**, 41, 31-39, 1998.
- PARRILLO, JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **Engl. J. Med.**, 328, 1471-1477, 1993.
- PAYA, D; GRAY, GA; FLEMING, I; STOCLET, JC. Effect of dexamethasone on the onset and persistence of vascular hyporeactivity induced by E. coli lipopolysaccharide in rats. **Circ. Shock.**, 41, 103-112, 1993a.
- PAYA, D; GRAY, GA; STOCLET, JC. Effects of methylene blue on blood pressure and reactivity to norepinephrine in endotoxemic rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 21, 926-930, 1993b.
- PAYA, D; MAUPOIL, V; SCHOTT, C; ROCHETTE, L; STOCLET, JC. Temporal relationships between levels of circulating NO derivatives, vascular NO production and hyporeactivity to noradrenaline induced by endotoxin in rats. **Cardiovasc. Res.**, 30, 952-959, 1995a.
- PAYA, D; STOCLET, JC. Involvement of bradykinin and nitric oxide in the early hemodynamic effects of lipopolysaccharide in rats. **Shock**, 3, 376-379, 1995b.
- PETERSSON, J; ZYGMUNT, PM; HOGESTATT, ED. Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. **Br. J. Pharmacol.** 120, 1344-1350, 1997.
- PETROS, A; LAMB, G; LEONE, A; MONCADA, S; BENNETT, D; VALLANCE, P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. **Cardiovasc. Res.**, 28, 34-9, 1994.
- PIEPOT, HA; GROENEVELD, AB; VAN LAMBALGEN, AA; SIPKEMA, P. The role of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-mediated

hyporeactivity to vasoconstrictors differs among isolated rat arteries. **Clin. Sci. (Lond.)**, 102, 297-305, 2002.

PLEINER J, MITTERMAYER F, SCHALLER G, MACALLISTER RJ, WOLZT M. High doses of vitamin C reverse Escherichia coli endotoxin-induced hyporeactivity to acetylcholine in the human forearm. **Circulation**, 106, 1460-1464, 2002.

PLEINER, J; MITTERMAYER, F; SCHALLER, G; MARSIK, C; MACALLISTER, RJ; WOLZT, M. Inflammation-induced vasoconstrictor hyporeactivity is caused by oxidative stress. **J. Am. Coll. Cardiol.**, 42, 1656-1662, 2003.

QUEZADO, ZM; NATANSON, C. Systemic hemodynamic abnormalities and vasopressor therapy in sepsis and septic shock. **Am. J. Kidney Dis.**, 20, 214-222, 1992.

RAHMAN, M; WRIGHT, JT JR; DOUGLAS, JG. The role of the cytochrome P450-dependent metabolites of arachidonic acid in blood pressure regulation and renal function: a review. **Am. J. Hypertens.**, 10, 356-365, 1997.

REES, DD; CELLEK, S; PALMER, RM; MONCADA, S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 173, 541-547, 1990.

RICHARDSON, G; BENJAMIN, N. Potential therapeutic uses for S-nitrosothiols. **Clin. Sci.**, 102, 99-105, 2002.

RIORDAN, JF. Angiotensin II: biosynthesis, molecular recognition, and signal transduction. **Cell Mol. Neurobiol.**, 15, 637-651, 1995.

RODRIGUEZ, J; MALONEY, RE; RASSAF, T; BRYAN, NS; FEELISCH, M. Chemical nature of nitric oxide storage forms in rat vascular tissue. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 100, 336-341, 2003.

RUBANYI, GM; VANHOUTTE, PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. **Am. J. Physiol.** 250, H815- H821, 1986.

RUETTEN, H; SOUTHAN, GJ; ABATE, A; THIEMERMANN, C. Attenuation of endotoxin-induced multiple organ dysfunction by 1-amino-2-hydroxy-guanidine, a potent inhibitor of inducible nitric oxide synthase. **Br. J. Pharmacol.**, 118, 261-270, 1996a.

RUETTEN, H; THIEMERMANN, C. Effect of selective blockade of endothelin ET_B receptors on the liver dysfunction and injury caused by endotoxaemia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, 119, 479-486, 1996b.

- RUETTEN, H; THIEMERMANN, C; VANE, JR. Effects of the endothelin receptor antagonist, SB 209670, on circulatory failure and organ injury in endotoxic shock in the anaesthetized rat. **Br. J. Pharmacol.**, 118, 198-204, 1996c.
- RUIZ, E; SLOW, RC; BARTLETT, SR; JENNER, AM; SATO, H; BANNAI, S; MANN, GE. Vitamin C inhibits diethylmaleate-induced L-cystine transport in human vascular smooth muscle cells. **Free Radic. Biol. Med.**, 34, 103-110, 2003.
- RUTH, P. Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting. **Pharmacol. Ther.**, 82, 355-372, 1999.
- SALOMONE, S; MOREL, N; GODFRAIND, T. A therapeutic dosage of amlodipine prevents vascular hyporeactivity induced in rats by lipopolysaccharide. **Naynyn Schm. Arch. Pharmacol.**, 357, 252-259, 1998.
- SALVEMINI, D; MISKO, TP; MASFERRER, JL; SEIBERT, K; CURRIE, MG; NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 90, 7240-7244, 1993.
- SALVEMINI, D; CUZZOCREA, S. Superoxide, superoxide dismutase and ischemic injury. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, 3, 886-995, 2002.
- SANDS, KE; BATES, DW; LANKEN, PN; GRAMAN, PS; HIBBERD, PL; KAHN, KL; PARSONNET, J; PANZER, R; ORAV, EJ; SNYDMAN, DR. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. **JAMA.**, 278, 234-240, 1997.
- SAVILLE B. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. **Analyst**, 83, 670-672, 1958.
- SCHARFSTEIN, JS; KEANEY, JF JR; SLIVKA, A; WELCH, GN; VITA, JA; STAMLER, JS; LOSCALZO, J. In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols. **J. Clin. Invest.**, 94, 1432-1439, 1994.
- SCHRODER, H; LEITMAN, DC; BENNETT, BM; WALDMAN, SA; MURAD, F. Glyceryl trinitrate-induced desensitization of guanylate cyclase in cultured rat lung fibroblasts. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 245, 413-418, 1988.
- SCHUBERT, R; NELSON, MT. Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. **Trends Pharmacol. Sci.**, 22, 505-512, 2001.

- SCOTT, WS; NAKAYAMA, DK. Escherichia coli lipopolysaccharide downregulates soluble guanylate cyclase in pulmonary artery smooth muscle. *J. Surg. Res.*, 80, 309-314, 1998.
- SEYDEL, U; SCHEEL, O; MULLER, M; BRANDENBURG, K; BLUNCK, R. A K⁺ channel is involved in LPS signaling. *J. Endotoxin. Res.*, 7, 243-247, 2001.
- SHIRASAKI, Y; SU, C. Endothelium removal augments vasodilation by sodium nitroprusside and sodium nitrite. *Eur. J. Pharmacol.*, 114, 93-96, 1985.
- SILVA-SANTOS, JE; ASSREUY, J. Long-lasting changes of rat blood pressure to vasoconstrictors and vasodilators induced by nitric oxide donor infusion: involvement of potassium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290, 380-387, 1999.
- SILVA-SANTOS, JE; TERLUK, MR; ASSREUY, J. Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. *Shock*, 17, 70-76, 2002.
- SIMON, F; VARELA, D; EGUIGUREN, AL; DIAZ, LF; SALA, F; STUTZIN, A. Hydroxyl radical activation of a Ca(2+)-sensitive nonselective cation channel involved in epithelial cell necrosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 287, C963-C970, 2004.
- SOGO, N; CAMPANELLA, C; WEBB, DJ; MEGSON, IL. S-nitrosothiols cause prolonged, nitric oxide-mediated relaxation in human saphenous vein and internal mammary artery: therapeutic potential in bypass surgery. *Br. J. Pharmacol.*, 131, 1236-1244, 2000a.
- SOGO, N; WILKINSON, IB; MACCALLUM, H; KHAN, SQ; STRACHAN, FE; NEWBY, DE; MEGSON, IL; WEBB, DJ. A novel S-nitrosothiol (RIG200) causes prolonged relaxation in dorsal hand veins with damaged endothelium. *Clin. Pharmacol. Ther.* 68, 75-81, 2000b.
- SONG, J; JANG, YY; SHIN, YK; LEE, MY; LEE, C. Inhibitory action of thimerosal, a sulfhydryl oxidant, on sodium channels in rat sensory neurons. *Brain Res.*, 864, 105-113, 2000.
- SORRENTINO, R; D'EMMANUELE DI VILLA BIANCA, R; LIPPOLIS, L; SORRENTINO, L; AUTORE, G; PINTO, A. Involvement of ATP-sensitive potassium channels in a model of a delayed vascular hyporeactivity induced by lipopolysaccharide in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 127, 1447-1453, 1999.
- SOTO, MA; GONZALEZ, C; LISSI, E; VERGARA, C; LATORRE, R. Ca(2+)-activated K⁺ channel inhibition by reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 282, C461-C471, 2002.

- SOÚLERE, L; STURN, JC; NÚÑEZ-VERGANA, LJ; HOFFMANN, P; PÉRIE, J. Synthesis, electrochemical, and spectroscopic studies of novel S-nitrosothiols. **Tetrahedron.**, 57, 7173-7180, 2001.
- STAMLER, JS; SINGEL, DJ; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science.**, 25, 1898-1902, 1992.
- STAMLER, JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions with nitric oxide. **Cell**, 78, 931-936, 1994.
- STAMLER, JS; LAMAS, S; FANG, FC. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. **Cell.**, 106, 675-683, 2001.
- STASCH, JP; ALONSO-ALIJA, C; APELER, H; DEMBOWSKY, K; FEURER, A; MINUTH, T; PERZBORN, E; SCHRAMM, M; STRAUB, A. Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. **Br. J. Pharmacol.**, 135, 333-343, 2002.
- STOCLET, JC; MULLER, B; ANDRIANTSITOHAINA, R; KLESCHYOV, A. Overproduction of nitric oxide in pathophysiology of blood vessels. **Biochemistry (Mosc).**, 63, 826-832, 1998.
- STROES, E; HIJMERING, M; VAN ZANDVOORT, M; WEVER, R; RABELINK, TJ; VAN FAASSEN, EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. **FEBS Lett.** 438, 161-164, 1998.
- SZABO, C; MITCHELL, JA; THIEMERMANN, C; VANE, JR. Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock. **Br. J. Pharmacol.**, 108, 786-792, 1993a.
- SZABO, C; THIEMERMANN, C; VANE, JR. Inhibition of the production of nitric oxide and vasodilator prostaglandins attenuates the cardiovascular response to bacterial endotoxin in adrenalectomized rats. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, 253, 233-238, 1993b.
- SZABO, C; SOUTHAN, GJ; THIEMERMANN, C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiouraea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 91, 12472-12476, 1994a.
- SZABO, C; THIEMERMANN, C; WU, CC; PERRETTI, M; VANE, JR. Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.**, 91, 271-275, 1994b.
- TAMANDL, D; BAHRAMI, M; WESSNER, B; WEIGEL, G; PLODER, M; FURST, W; ROTH, E; BOLTZ-NITULESCU, G; SPITTLER, A. Modulation of toll-like

receptor 4 expression on human monocytes by tumor necrosis factor and interleukin-6: tumor necrosis factor evokes lipopolysaccharide hyporesponsiveness, whereas interleukin-6 enhances lipopolysaccharide activity. **Shock**, 20, 224-229, 2003.

TANG, XD; DAGGETT, H; HANNER, M; GARCIA, ML; MCMANUS, OB; BROT, N; WEISSBACH, H; HEINEMANN, SH; HOSHI, T. Oxidative regulation of large conductance calcium-activated potassium channels. **J. Gen. Physiol.**, 117, 253-274, 2001.

TANIGUCHI, J; FURUKAWA, KI; SHIGEKAWA, M. Maxi K⁺ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. **Pflugers Arch.**, 423, 167-172, 1993.

TAVARES-MURTA, BM; CUNHA, FQ; FERREIRA, SH. The intravenous administration of tumor necrosis factor alpha, interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. **Br. J. Pharmacol.**, 124, 1369-1374, 1998.

TERLUK, MR; DA SILVA-SANTOS JE; ASSREUY J. Involvement of soluble guanylate cyclase and calcium-activated potassium channels in the long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine induced by nitric oxide in rat aorta. **Nayn Schm. Arch. Pharmacol.**, 361, 477-483, 2000.

TERLUK, MR; SILVA, EDC; ANTUNES, TT; ASSREUY, J. The presence of the endothelial layer reduces nitric oxide-mediated hyporesponsiveness to phenylephrine in rat aorta. **Endothelium**, 1, 181-187, 2004.

THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock. **Gen. Pharmacol.**, 29, 159-166, 1997.

TODOROVIC, SM; MEYENBURG, A; JEVTOVIC-TODOROVIC, V. Redox modulation of peripheral T-type Ca²⁺ channels in vivo: alteration of nerve injury-induced thermal hyperalgesia. **Pain**, 109, 328-339, 2004.

TSAO, CM; HO, ST; CHEN, A; WANG, JJ; LI, CY; TSAI, SK; WU, CC. Low-dose dexamethasone ameliorates circulatory failure and renal dysfunction in conscious rats with endotoxemia. **Shock**, 21, 484-491, 2004.

UENO, M; LEE, TJ. Endotoxin decreases the contractile responses of the porcine basilar artery to vasoactive substances. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, 13, 712-719, 1993.

VALLANCE, P; MONCADA, S. Role of endogenous nitric oxide in septic shock. **New Horiz.**, 1, 77-86, 1993.

- VALLET, B. Bench-to-bedside review: endothelial cell dysfunction in severe sepsis: a role in organ dysfunction? **Crit. Care**, 7, 130-138, 2003.
- VAN DER ZYPP A, MAJEWSKI H. Effect of cGMP inhibitors on the actions of nitrodilators in rat aorta. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 25, 38-43, 1998.
- VANE, JR. Inhibitors of prostaglandin, prostacyclin, and thromboxane synthesis. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.** 4, 27-44, 1978.
- VAUGHN, MW; KUO, L; LIAO, JC. Estimation of nitric oxide production and reaction rates in tissue by use of a mathematical model. **Am. J. Physiol.**, 274, H2163-H2176, 1998.
- VAYSSETTES-COURCHAY, C; CHATAIGNEAU, M; PROTIN, C; RAGONNET, C; VERBEUREN, TJ. Cutaneous venous dysfunction studied in vivo in the LPS-treated rabbit: implication of NO in saphenous vein hyporeactivity. **Naunyn Schm. Arch. Pharmacol.**, 367, 516-523, 2003.
- VICTOR, VM; GUAYERBAS, N; GARROTE, D; DEL RIO, M; DE LA FUENTE, M. Modulation of murine macrophage function by N-acetylcysteine in a model of endotoxic shock. **Biofactors**. 10, 347-357, 1999.
- VIINIKKA, L. Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, 56, 577-581, 1996.
- VILLAMOR, E; PEREZ VIZCAINO, F; TAMARGO, J; MORO, M. Effects of group B Streptococcus on the responses to U46619, endothelin-1, and noradrenaline in isolated pulmonary and mesenteric arteries of piglets. **Pediatr Res.**, 40, 827-833, 1996.
- VINCENT, JL; ZHANG, H; SZABO, C; PREISER, JC. Effects of nitric oxide in septic shock. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 161, 1781-1785, 2000.
- VIOLI, F; MARINO, R; MILITE, MT; LOFFREDO, L. Nitric oxide and its role in lipid peroxidation. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, 15, 283-288, 1999.
- VLASOVA, MA; VANIN, AF; MULLER, B; SMIRIN, BV; MALYSHEV, IY; MANUKHINA, EB. Detection and description of various stores of nitric oxide store in vascular wall. **Bull. Exp. Biol. Med.**, 136, 226-230, 2003.
- WANECEK, M; WEITZBERG, E; RUDEHILL, A; OLDNER, A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. **Eur. J. Pharmacol.**, 407, 1-15, 2000.
- WANG, K; ZHANG, W; XIAN, M; HOU, YC; CHEN, XC; CHENG, JP; WANG, PG. New chemical and biological aspects of S-nitrosothiols. **Curr. Med. Chem.**, 8, 821-834, 2000.

- WAYMACK, JP; GUZMAN, RF; MASON, AD JR, PRUITT, BA JR. Effect of prostaglandin E in multiple experimental models. VII. Effect on resistance to sepsis. **Burns.**, 16, 9-12, 1990.
- WINK, DA; COOK, JA; KIM, SY; VODOVOTZ, Y; PACELLI, R; KRISHNA, MC; RUSSO, A; MITCHELL, JB; JOURD'HEUIL, D; MILES, AM; GRISHAM, MB. Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress. **J. Biol. Chem.**, 272, 11147-11151, 1997.
- WINK, DA; MITCHELL, JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radic. Biol. Med.**, 25, 434-456, 1998.
- WOLKOW, PP. Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. **Inflamm. Res.**, 47, 152-166, 1998.
- WONG, HR; CARCILLO, JA; BURCKART, G; SHAH, N; JANOSKY, JE. Increased serum nitrite and nitrate concentrations in children with the sepsis syndrome. **Crit. Care Med.**, 23, 835-842, 1995.
- WU M, PRITCHARD KA JR, KAMINSKI PM, FAYNGERSH RP, HINTZE TH, WOLIN MS. Involvement of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite. **Am. J. Physiol.**, 266, H2108- H2113, 1994a.
- WU, CC; SZABO, C; CHEN, SJ; THIEMERMANN, C; VANE, JR. Activation of soluble guanylyl cyclase by a factor other than nitric oxide or carbon monoxide contributes to the vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents in the aorta of rats treated with endotoxin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 201, 436-442, 1994b.
- WU, CC; THIEMERMANN, C; VANE, JR. Glibenclamide-induced inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase in cultured macrophages and in the anaesthetized rat. **Br. J. Pharmacol.**, 114, 1273-1281, 1995a.
- WU, CC; CHEN, SJ; SZABO, C; THIEMERMANN, C; VANE, JR. Aminoguanidine attenuates the delayed circulatory failure and improves survival in rodent models of endotoxic shock. **Br. J. Pharmacol.**, 114, 1666-16672, 1995b.
- WU, CC; CROXTALL, JD; PERRETTI, M; BRYANT, CE; THIEMERMANN, C; FLOWER, RJ; VANE, JR. Lipocortin 1 mediates the inhibition by dexamethasone of the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 92, 3473-3477, 1995c.

- WU, CC; CHEN, SJ; YEN, MH. Nitric oxide-independent activation of soluble guanylyl cyclase contributes to endotoxin shock in rats. **Am. J. Physiol.**, 275, H1148- H1157, 1998.
- WU, CC; LIAO, MH; CHEN, SJ; CHOU, TC; CHEN, A; YEN, MH. Terbutaline prevents circulatory failure and mitigates mortality in rodents with endotoxemia. **Shock**, 14, 60-67, 2000.
- WU, KK. Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 962, 122-130, 2002.
- WU, F; WILSON, JX; TYML, K. Ascorbate protects against impaired arteriolar constriction in sepsis by inhibiting inducible nitric oxide synthase expression. **Free Radic. Biol. Med.**, 37, 1282-1289, 2004.
- WULFF, H; GUTMAN, GA; CAHALAN, MD; CHANDY, KG. Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1. **Biol. Chem.**, 276, 32040-32045, 2001.
- WYCKOFF, TJ; RAETZ, CR; JACKMAN, JE. Antibacterial and anti-inflammatory agents that target endotoxin. **Trends Microbiol.**, 1998.
- XIE, QW; CHO, HJ; CALAYCAY, J; et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, 256, 225-228, 1992.
- XU, L; EU, JP; MEISSNER, G; STAMLER, JS. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. **Science**, 279, 234-237, 1998.
- YAN, JJ; JUNG, JS; LEE, JE; LEE, J; HUH, SO; KIM, HS; JUNG, KC; CHO, JY; NAM, JS; SUH, HW; KIM, YH; SONG, DK. Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. **Nat. Med.**, 10, 161-167, 2004.
- ZINGARELLI, B; HASKO, G; SALZMAN, AL; SZABO, C. Effects of a novel guanylyl cyclase inhibitor on the vascular actions of nitric oxide and peroxynitrite in immunostimulated smooth muscle cells and in endotoxic shock. **Crit. Care Med.**, 27, 2019-2022, 1999.
- ZIOLO, MT; KATOH, H; BERS, DM. Expression of inducible nitric oxide synthase depresses beta-adrenergic-stimulated calcium release from the sarcoplasmic reticulum in intact ventricular myocytes. **Circulation**, 104, 2961-2966, 2001.
- ZISMAN, DA; KUNKEL, SL; STRIETER, RM; GAULDIE, J; TSAI, WC; BRAMSON, J; WILKOWSKI, JM; BUCKNELL, KA; STANDIFORD, TJ. Anti-

interleukin-12 therapy protects mice in lethal endotoxemia but impairs bacterial clearance in murine *Escherichia coli* peritoneal sepsis. **Shock**, 8, 349-356, 1997.

ZOCCARATO, F; CAVALLINI, L; VALENTE, M; ALEXANDRE, A. Modulation of glutamate exocytosis by redox changes of superficial thiol groups in rat cerebrocortical synaptosomes. **Neurosci. Lett.**, 274, 107-110, 1999.

ZUSMAN, RM. Effects of converting-enzyme inhibitors on the renin-angiotensin-aldosterone, bradykinin, and arachidonic acid-prostaglandin systems: correlation of chemical structure and biologic activity. **Am. J. Kidney Dis.** 10, 13-23, 1987.

ZYGMUNT, PM; EDWARDS, G; WESTON, AH; DAVIS, SC; HOGESTATT, ED. Effects of cytochrome P450 inhibitors on EDHF-mediated relaxation in the rat hepatic artery. **Br. J. Pharmacol.**, 118, 1147-1152, 1996.

8. ANEXO

Os resultados do presente estudo foram publicados e submetidos a publicação:

TERLUK, MR; SILVA, EDC; ANTUNES, TT; ASSREUY, J. The presence of the endothelial layer reduces nitric oxide-mediated hyporesponsiveness to phenylephrine in rat aorta. ***Endothelium***, 1, 181-187, 2004.

TERLUK, MR; CUNHA DA SILVA, ED; SILVA-SANTOS, JE.; ASSREUY, J. Sulphydryl oxidation prevents and reverts nitric oxide-induced long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine in rat aorta and blood pressure. ***Submitted.***

Outros trabalhos publicados no período e em fase de finalização para submissão:

SILVA-SANTOS, JE; TERLUK, MR; ASSREUY, J. Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. ***Shock***, 17, 70-76, 2002.

RATTMANN, YD; TERLUK, MR; SOUZA, WM; SANTOS, AM; BIAVATTI, MW; TORRES, LB; MESIA-VELA, S; RIECK, L; MARQUES, MCAM. An alkaloidic fraction of *Himatanthus Lancifolius* (Muelli. Arg.) Woodson decreases in vitro contractile of non-vascular and vascular smooth muscle by a calcium-dependent pathway. ***J. Ethnopharmacol.***, 100, 268-275, 2005.

TERLUK, MR; FERNANDES, F; ASSREUY, J. Sulphydryl oxidation protects rat aorta from LPS-induced long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine and increases survival of mice injected with *E. coli*.

TERLUK, MR; ASSREUY, J. Analysis of mechanisms involved the long-lasting relaxation mediated by L-cysteine in rat aorta rings exposed to nitric oxide.